

UNIVERSITÉ D'ARTOIS

UFR des Sciences

École doctorale biologie-santé de Lille (ED 446)

Laboratoire de physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique
EA 2465 IMPRT-IFR 114

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ
EN SCIENCES DE LA VIE

Présentée par
Barbara DERACINOIS

**Analyse protéomique différentielle des cellules endothéliales
de la barrière hémato-encéphalique : identification de
protéines induites par les cellules gliales**

Date de soutenance : 19 décembre 2012

Composition du jury :

Rapporteurs :

Dr Karine ANDRIEUX
Pr Laurence SABATIER

UMR CNRS 8612, Paris, France
LSMBO, IPHC, Strasbourg, France

Examineurs :

Pr Roméo CECHELLI
Dr Christophe FLAHAUT (Co-encadrant)
Dr Reinhard GABATHULER
Pr Yannis KARAMANOS (Directeur de thèse)
Pr Annick PIERCE
Dr Frédéric PONT

Université d'Artois, Lens, France
Université d'Artois, Lens, France
BiOasis Technologies Inc., Vancouver, Canada
Université d'Artois, Lens, France
Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France
UMR 5165 CNRS, Toulouse, France

Je remercie très sincèrement les membres du jury,

Mesdames le Professeur Laurence SABATIER et le Docteur Karine ANDRIEUX,

C'est un immense honneur pour moi de vous compter parmi les membres de ce jury en tant que rapporteur. Soyez assurées de mon estime et de mon plus grand respect pour avoir accepté cette lourde tâche.

Madame le Professeur Annick PIERCE et Messieurs les Docteurs Reinhard GABATHULER et Frédéric PONT,

Je suis très honorée que vous ayez accepté d'être les examinateurs de ce travail. Vos examens de cette thèse et des travaux qui y sont présentés seront un privilège. Veuillez agréer toute ma gratitude et mon plus profond respect.

Monsieur le Professeur Roméo CECHELLI,

Je vous remercie sincèrement de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire afin d'y réaliser mes travaux de recherche. Vous m'avez permis de vivre une expérience très enrichissante. Soyez assuré de ma plus grande reconnaissance.

Monsieur le Professeur Yannis KARAMANOS,

Je vous remercie très sincèrement pour ces quatre années passées à vos côtés. Votre grande disponibilité, votre sympathie et vos précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. Votre soutien et votre présence se sont avérés déterminants pour mener ce travail à terme. Un grand merci pour tout.

Monsieur le Docteur Christophe FLAHAUT,

J'ai tout d'abord su apprécier votre grand talent d'enseignant et de pédagogue. Vous m'avez par la suite accompagnée dans la fameuse épreuve du Master Recherche et pour finir dans la réalisation de cette thèse. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour ce long suivi et pour cet apprentissage du métier de chercheur. Un profond merci pour tout !

J'exprime également tous mes remerciements à :

Vincent, aujourd'hui je tiens à te faire part que nos discussions, aussi furtives soient-elles, ont été pour moi très constructives. Merci pour tes nombreux encouragements et merci d'avoir cru en moi. J'espère honorer les magnifiques illustrations que tu as réalisé pour le laboratoire en les utilisant dans ce manuscrit.

Sophie, au cours de ces années, ta grande disponibilité, ton enthousiasme, tes conseils et surtout ta joie de vivre m'ont permis d'avancer et de progresser. Puisses-tu trouver dans ce travail le témoignage de mon attachement, de mon profond respect et de ma reconnaissance pour tes conseils avisés et ton précieux soutien. Merci et encore merci !

Mélanie, tu as été ma plus fervente confidente et tu as toujours su me remotiver quand le moral n'était plus là. Nos échappées, qu'elles furent sportives ou non, ont été pour moi des purs moments de détente. Je n'oublierai pas ta grande contribution dans l'accomplissement de cette thèse. Je t'en remercie profondément.

Pietra, tu as été le rayon de soleil de ces dures années de travail. Merci d'apporter au laboratoire cette fraîcheur qui te correspond si bien.

Johan, même si ta présence est source de déconcentration, ta dose d'humour quotidienne était pour moi une source de motivation dans la réalisation de ces travaux de thèse. Merci d'avoir partagé mon bureau et d'avoir supporté mon stress de ces derniers mois.

Caroline, je te remercie pour les nombreux conseils que tu as pu me donner, le temps que tu m'as consacré mais surtout pour les moments agréables passés à tes côtés.

Gwënaël, je te remercie très sincèrement pour tes précieux conseils, ton aide et pour l'expérience enrichissante que tu m'as apportée tout au long de ces quatre dernières années.

Je remercie chaque membre du LBHE et du personnel de l'Université d'Artois. Je vous suis sincèrement reconnaissante pour votre aide, vos conseils et vos encouragements. C'est toujours un plaisir de croiser l'un de vous dans un laboratoire, en salle de pause ou encore dans un couloir que ce soit pour partager des moments scientifiques ou tout simplement bavarder. Bonne continuation à tous !

Je remercie toutes les personnes, qui de près ou de loin, ont contribué, de n'importe quelle façon, à la réalisation de ce manuscrit. Trouvez ici l'expression de ma gratitude.

J'ai une pensée énorme pour mes proches qui m'ont soutenu depuis le commencement. Je tenais à vous dire que vous êtes la source d'énergie m'ayant permis d'aboutir à ce travail.

À notre étoile, Stéphane.

Liste des figures.....	- 8 -
Liste des tableaux	- 10 -
Liste des annexes	- 10 -
Résumé	- 11 -
Abstract	- 12 -
Liste des abréviations.....	- 13 -
 Présentation du travail de thèse	 - 15 -

Première partie : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Pourquoi et comment étudier les protéines cytoplasmiques des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique ?

Chapitre I : Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux : support anatomique de la barrière hémato-encéphalique (BHE).....	- 22 -
1. Caractéristiques générales de la BHE.....	- 23 -
1.1. Localisation et environnement cellulaire.....	- 23 -
1.2. Phénotype associé à la fonction de BHE	- 24 -
1.3. Induction et maintien des propriétés de barrière.....	- 26 -
1.3.1. Astrocytes	- 26 -
1.3.2. Péricytes	- 27 -
1.3.3. Neurones	- 27 -
1.3.4. Membrane basale	- 28 -
2. Complexe jonctionnel intercellulaire.....	- 29 -
2.1. Restriction de la perméabilité paracellulaire	- 29 -
2.2. Protéines membranaires du complexe jonctionnel	- 30 -
2.3. Protéines cytoplasmiques associées au complexe jonctionnel.....	- 31 -
3. Transporteurs et récepteurs au service d'une barrière sélective	- 32 -
3.1. Mécanismes d'efflux	- 33 -
3.2. Transport des nutriments	- 34 -
3.2.1. Diffusion passive	- 34 -
3.2.2. Transport facilité et transport actif	- 34 -
3.2.3. Transport spécialisé par vésicules.....	- 36 -
3.3. Stratégies de vectorisation.....	- 37 -
4. Enzymes de la barrière métabolique.....	- 39 -
4.1. Enzymes de la membrane plasmique	- 39 -
4.2. Enzymes cytoplasmiques.....	- 40 -
4.2.1. Enzymes mitochondriales	- 40 -
4.2.2. Enzymes du réticulum endoplasmique	- 40 -
5. Protéines et mécanismes cytoplasmiques	- 40 -
5.1. Cytosquelette.....	- 41 -

5.2. Organites	- 43 -
5.3. Transduction du signal	- 44 -
Chapitre II : Quel modèle biologique choisir pour l'analyse protéomique des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique ?	- 47 -
1. Études adaptées au suivi de molécules d'intérêt.....	- 49 -
1.1. Études <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	- 49 -
1.1.1. Approches <i>in vivo</i> non invasives	- 49 -
1.1.2. Approches <i>in vivo</i> invasives	- 50 -
1.2. Études <i>in silico</i>	- 51 -
1.3. Études <i>in vitro</i> non cellulaires.....	- 52 -
1.4. Utilisations majeures de ces modèles	- 53 -
2. Études adaptées à des analyses approfondies des mécanismes cellulaires et moléculaires	- 53 -
2.1. Modèles <i>in vitro</i> de microvaisseaux cérébraux isolés	- 54 -
2.2. Modèles cellulaires <i>in vitro</i>	- 54 -
2.2.1. Mise en culture des CEs	- 55 -
2.2.2. Différents modèles cellulaires.....	- 57 -
3. Choix d'un modèle d'étude adéquat pour l'étude des protéines des CEs de BHE- 62 -	- 62 -
3.1. Quel type de modèle choisir ?.....	- 62 -
3.2. Modèle <i>in vitro</i> de BHE développé au laboratoire.....	- 62 -
Chapitre III : Approches protéomiques globales, comparatives et quantitatives	- 65 -
1. Spectrométrie de masse	- 68 -
2. Quantification sur protéine intacte par gel d'électrophorèse.....	- 71 -
2.1. Principe de l'électrophorèse	- 71 -
2.2. Visualisation des protéines pour leur quantification « en gel »	- 74 -
2.2.1. Révélation des protéines par coloration post-électrophorétique	- 74 -
2.2.2. Révélation des protéines par coloration pré-électrophorétique	- 75 -
2.3. Avantages et limites des analyses électrophorétiques	- 75 -
3. Quantification des protéines via l'analyse des peptides par spectrométrie de masse	- 76 -
3.1. Séparation des protéines pour la simplification des échantillons	- 76 -
3.2. Séparation des peptides	- 77 -
3.2.1. Séparation des peptides par électrophorèse	- 77 -
3.2.2. Séparation des peptides par HPLC	- 77 -
3.3. Quantification des protéines à partir des peptides.....	- 79 -
3.3.1. Quantification relative	- 80 -
3.3.2. Quantification absolue.....	- 91 -
3.4. Avantages et limites de la quantification sur peptides	- 93 -

Deuxième partie : TRAVAUX PERSONNELS

Deux stratégies protéomiques pour l'analyse comparative des protéines cytoplasmiques des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique

Chapitre I : Introduction	- 99 -
1. Modèle biologique utilisé	- 100 -
2. État du sujet dans le laboratoire au commencement de la thèse.....	- 102 -
Chapitre II : Le fractionnement organique des protéines	- 106 -
1. Première approche sur l'extrait total de protéines.....	- 107 -
2. Approche par fractionnement préalable des protéines	- 108 -
2.1. Principe du fractionnement organique.....	- 109 -
2.2. Évaluation de la reproductibilité et de l'efficacité du fractionnement.....	- 109 -
2.2.1. Dosage des protéines après fractionnement	- 109 -
2.2.2. Analyse par 1D-PAGE du fractionnement	- 110 -
2.2.3. Analyse par 2D-PAGE du fractionnement organique.....	- 111 -
3. Discussion	- 112 -
Chapitre III : Stratégie protéomique comparative sans marquage pour l'identification de protéines issues des BCECs et induites par les cellules gliales : implication de la TNAP et de l'EHD1 dans le phénotype BHE.....	- 115 -
1. Analyse par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS des hydrolysats tryptiques des fractions	- 118 -
1.1. Cartes peptidiques	- 118 -
1.2. Homogénéité des données de spectrométrie de masse.....	- 120 -
1.3. Analyse globale des protéines identifiées	- 121 -
2. Analyses biochimiques de deux protéines d'intérêt : la phosphatase alcaline tissu-non spécifique (TNAP) et la protéine 1 contenant un domaine d'homologie à Eps15 (EHD1)	- 126 -
2.1. Immunocytochimie	- 126 -
2.2. RT-PCR et western blot	- 127 -
2.3. Activité enzymatique de l'AP et inhibition de la TNAP par le levamisole.....	- 130 -
3. Discussion	- 134 -
3.1. Extraction des protéines solubles dans le Triton X-100	- 134 -
3.2. Avantages et inconvénients des analyses chromatographiques.....	- 134 -
3.3. Identifications protéiques	- 135 -
Chapitre IV : Stratégie ICPL pour l'identification et la quantification de protéines issues des BCECs et induites par les cellules gliales : implication de protéines antioxydantes dans le phénotype BHE.....	- 156 -
1. Marquage ICPL : principe et mises au point.....	- 157 -
1.1. Principe du marquage des protéines par la stratégie ICPL.....	- 157 -
1.2. Mises au point.....	- 158 -
1.2.1. Marquage d'un mélange de six protéines	- 158 -

1.2.2. Marquage d'un extrait protéique de BCECs	- 160 -
1.3. Stratégie employée	- 162 -
2. Analyse par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS des hydrolysats trypsiques des fractions	- 164 -
2.1. Cartes peptidiques	- 164 -
2.2. Homogénéité des données de spectrométrie de masse.....	- 165 -
2.3. Analyse globale des identifications et de la quantification	- 166 -
3. Validation biochimique de deux protéines d'intérêt : la superoxyde dismutase 1 (SODC) et la protéine DJ-1	- 172 -
4. Discussion	- 173 -
4.1. Analyses ICPL nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS	- 173 -
4.2. Identifications protéiques	- 175 -
Discussion	- 182 -
1. Notre stratégie protéomique	- 184 -
2. La BHE, un obstacle à la délivrance des médicaments à visée cérébrale.....	- 188 -
3. La BHE, implication dans de nombreuses pathologies	- 188 -
Bibliographie	- 191 -

Liste des figures

Figure 1 : L'unité neuro-glio-vasculaire.....	24 -
Figure 2 : Comparaison des caractéristiques morphologiques des capillaires périphériques et des capillaires cérébraux.....	25 -
Figure 3 : Schéma simplifié représentant les principales protéines (membranaires et cytoplasmiques) impliquées dans le complexe jonctionnel intercellulaire.....	30 -
Figure 4 : Les différentes voies de transport au travers de la BHE.	38 -
Figure 5 : Schéma montrant l'importance du cytosquelette dans l'organisation cellulaire.	41 -
Figure 6 : Représentation schématique illustrant l'hypothèse de l'importance de certains acteurs du remodelage du cytosquelette pour l'acquisition du phénotype de BHE.....	43 -
Figure 7 : Modèle <i>in vitro</i> de BHE du laboratoire.	63 -
Figure 8 : Schéma représentant les techniques les plus couramment employées en vue d'une analyse protéomique comparative et quantitative.	68 -
Figure 9 : Schéma général d'un spectromètre de masse.....	69 -
Figure 10 : Illustrations et comparaison de la 1D-PAGE et de la 2D-PAGE.....	72 -
Figure 11 : Principe de la 2D-PAGE conventionnelle.....	73 -
Figure 12 : 2D-PAGE vs HPLC.....	78 -
Figure 13 : Comparaison de la quantification <i>label free</i> (A) et de la quantification avec marquage par isotopes stables des protéines (B).....	79 -
Figure 14 : Modèle de culture <i>in vitro</i> de BHE utilisé dans notre étude protéomique comparative.	101 -
Figure 15 : Cartes peptidiques obtenues après élution en nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS des peptides issus du pool de protéines solubles dans le Triton X-100 des BCECs solo-cultivées.....	108 -
Figure 16 : Représentation schématique du fractionnement organique en acétonitrile.	109 -
Figure 17 : Concentration protéique après fractionnement en acétonitrile.	110 -
Figure 18 : Analyse qualitative du fractionnement par 1D-PAGE.....	111 -
Figure 19 : Analyse qualitative du fractionnement par 2D-PAGE.....	112 -
Figure 20 : Schéma illustrant la stratégie protéomique sans marquage.....	117 -
Figure 21 : Cartes peptidiques obtenues (stratégie <i>label free</i>).....	119 -
Figure 22 : Évaluation de l'homogénéité des données de masses (stratégie <i>label free</i>).	121 -
Figure 23 : Classification selon leur localisation cellulaire (composant cellulaire) des 447 protéines identifiées (stratégie <i>label free</i>).	122 -
Figure 24 : Évaluation globale des protéines identifiées dans les différentes fractions et séries expérimentales (stratégie <i>label free</i>).	123 -

Figure 25 : Classification des protéines spécifiques aux deux conditions cellulaires selon les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées.	- 125 -
Figure 26 : Immunolocalisation des protéines TNAP et EHD1 au sein des BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) et co-cultivées (Re-ind. BBB).....	- 127 -
Figure 27 : Validations biochimiques de la sur-expression de la TNAP et de l'EHD1 dans les BCECs co-cultivées.	- 129 -
Figure 28 : Dosage et inhibition médiée par le levamisole de l'activité enzymatique de l'AP au sein des BCECs.	- 131 -
Figure 29 : Effets du levamisole sur la monocouche de BCECs.	- 133 -
Figure 30 : Réaction chimique survenant lors du couplage covalent des fonctions amine libres (NH ₂) des protéines avec le réactif ICPL.	- 158 -
Figure 31 : Schéma illustrant la stratégie protéomique ICPL (<i>isotope-coded protein label</i>). -	163 -
Figure 32 : Cartes peptidiques obtenues (stratégie ICPL).	- 164 -
Figure 33 : Évaluation de l'homogénéité des données de masses (stratégie ICPL).	- 166 -
Figure 34 : Classification des 412 protéines identifiées (stratégie ICPL).....	- 167 -
Figure 35 : Évaluation globale du nombre de protéines quantifiées.	- 168 -
Figure 36 : Classification, selon leur fonction moléculaire, des protéines sur-exprimées dans les BCECs solo-cultivées ou co-cultivées.	- 172 -
Figure 37 : Validation biochimique de la sur-expression de la superoxyde dismutase, SODC et de la protéine DJ-1 dans les BCECs co-cultivées.	- 173 -
Figure 38 : Comparaison des stratégies (<i>label free versus</i> ICPL) employées.	- 185 -
Figure 39 : Comparaison des différentes approches protéomiques utilisées.	- 187 -

Liste des tableaux

Tableau I : Composants moléculaires principaux impliqués (ou prédits) dans le complexe jonctionnel intercellulaire.	- 32 -
Tableau II : Récapitulatif des principales techniques pour l'étude de la BHE et de leurs intérêts.	- 61 -
Tableau III : Avantages et limites des principales méthodes de quantification des protéines par spectrométrie de masse.	- 95 -
Tableau IV : Liste des protéines identifiées (au moins deux fois parmi chaque fraction ou les trois analyses nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS) spécifiquement dans l'une des deux conditions (Lim. BBB ou Re-ind. BBB) et pas dans la seconde.....	- 124 -
Tableau V : Amorces et conditions utilisées pour l'amplification des ARNm.	- 128 -
Tableau VI : Test du marquage ICPL sur un mélange de 6 protéines.....	- 160 -
Tableau VII : Liste des protéines quantifiées avec un facteur de régulation significatif entre les BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) ou co-cultivées (Re-ind. BBB).....	- 170 -

Liste des annexes

Annexe 1 : Communication affichée.....	-141-
Étude protéomique différentielle <i>label free</i> par nano-LC MS/MS pour une meilleure compréhension du phénotype barrière hémato-encéphalique. Deracinois B, Duban-Deweier S, Hachani J, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y. <i>Réunion annuelle de la Société d'Étude des Interfaces "Sang-Cerveau" (S.E.I.S.C.)</i> , 31 mai 2010, Paris, France.	
Annexe 2 : Publication.....	-143-
TNAP and EHD1 are over-expressed in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties. Deracinois B, Duban-Deweier S, Pottiez G, Cecchelli R, Karamanos Y, Flahaut C. (2012), <i>PLoS one</i> , 7(10) : e48428.	
Annexe 3 : Communication affichée.....	-180-
Analyse comparative du sous-protéome cytoplasmique de la barrière hémato-encéphalique : approche sans marquage et approche par marquage isotopique stable. Deracinois B, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y. <i>Congrès de la Société Française d'Électrophorèse et d'Analyse Protéomique (SFEAP)</i> , 15-17 octobre 2012, Rouen, France.	

En contrôlant le passage para- et transcellulaire des composés du sang vers le cerveau (et inversement), la barrière hémato-encéphalique (BHE) constitue la « gardienne » du compartiment cérébral. Ainsi, 95 % des composés thérapeutiques à visée cérébrale sont inefficaces *in vivo* du fait de la présence de la BHE qu'ils sont incapables de franchir. Bien que relativement connu dans son aspect physiologique, le phénotype BHE des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (BCECs) reste mal compris au regard des mécanismes moléculaires qui gouvernent son établissement et son maintien. Dans cette optique, à l'aide du modèle *in vitro* de BHE développé au laboratoire (co-culture de BCECs bovines et de cellules gliales de rats), nous avons réalisé deux études protéomiques comparatives afin d'**identifier les protéines cytoplasmiques potentiellement impliquées dans l'induction et le maintien de ce phénotype** : d'une part une approche qualitative sans marquage (*label free*) et d'autre part une approche quantitative grâce à un marquage isotopique préalable des protéines (*isotope-coded protein label*, ICPL).

De par leur complexité, les extraits protéiques bruts ont été soumis à un fractionnement organique avant analyse par chromatographie liquide « couplée » à la spectrométrie de masse (nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS). L'efficacité (ainsi que la reproductibilité) du fractionnement protéique utilisé a été démontrée par électrophorèse (1D-PAGE et 2D-PAGE) et par l'analyse comparée des données de masse obtenues à partir de trois séries expérimentales.

Les deux approches, *label free* et ICPL se sont révélées complémentaires et ont permis l'identification de nombreuses protéines dont certaines ont un intérêt particulier dans le cadre de la BHE. Pour l'approche *label free*, 447 protéines au total ont été identifiées (dont 166 nouvelles par rapport aux publications précédentes). Parmi elles, 11 protéines sont identifiées uniquement au sein des BCECs co-cultivées et 39 protéines au sein des BCECs solo-cultivées. L'approche ICPL, quant à elle, a permis l'identification de 412 protéines (dont 162 nouvelles). Parmi les 290 protéines quantifiées, 34 sont sur-exprimées et 47 sous-exprimées dans les BCECs co-cultivées. Quatre protéines d'un intérêt particulier dans le domaine de la BHE (phosphatase alcaline tissu-non spécifique, **TNAP** ; protéine 1 possédant un domaine d'homologie à Eps15, **EHD1** ; superoxyde dismutase, **SODC** et homologue 7 de la protéine de la maladie de Parkinson PARK7, **DJ-1**) ont fait l'objet de caractérisations biochimiques approfondies et ouvrent des pistes d'investigation sur des potentielles voies cellulaires induites par les cellules gliales et impliquées dans le phénotype BHE.

Mots clés : barrière hémato-encéphalique, modèle *in vitro*, protéomique, spectrométrie de masse, nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS.

Differential proteomic analysis of blood-brain barrier endothelial cells: identification of glial cells-induced proteins

Abstract

The blood-brain barrier (BBB) controls the para- and transcellular crossing of compounds from blood to brain (and inversely) and establishes the “gatekeepers” of the brain. The major part of therapeutic drugs developed to fight the brain diseases is deemed inefficient *in vivo* due to the presence of the BBB that they are unable to cross. Although relatively well known in its physiological aspect, the BBB phenotype of brain capillary endothelial cells (BCECs) remains largely under known and misunderstood in regards of the molecular mechanisms that govern its establishment and its maintenance. To this goal, using the *in vitro* BBB model developed in the laboratory (co-culture of bovine BCECs with rat glial cells), we performed two differential proteomic studies to **identify the main cytoplasmic proteins involved in the establishment and maintenance of this phenotype**: a qualitative label free approach and a quantitative isotope-coded protein labeling (ICPL) approach.

Due to their complexity, the protein crude extracts from BCECs were subjected to an organic sub-fractionation and each fraction was analysed by liquid chromatography coupled (off line) to mass spectrometry (nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS). The efficiency and the reproducibility of this organic sub-fractionation were demonstrated by electrophoresis (1D-PAGE and 2D-PAGE) and by the comparative analysis of the mass spectrometry data obtained from three experimental series.

The two different approaches, label free and ICPL, are complementary and led to the identification of numerous proteins, some of them being of particular interest for BBB. Four hundred and forty seven (447) proteins in total were identified (166 not yet described in previous reports) by label free approach. Among them, 11 proteins are specifically identified into co-cultured BCECs, and 39 proteins in solo-culture. The ICPL approach resulted in the identification of 412 proteins (162 news). Among the 290 quantified proteins, 34 were up-regulated and 47 down-regulated in co-cultured BCECs. Four proteins of particular interest for BBB (tissue-non specific alkaline phosphatase, **TNAP**; Eps15 homology domain containing protein 1, **EHD1**; superoxide dismutase, **SODC** and Parkinson disease protein 7 homolog PARK7, **DJ-1**) have been more deeply studied and they open new discovery prospects related to cellular pathways induced by glial cells and involved in the BBB phenotype.

Keywords: blood-brain barrier, *in vitro* model, proteomic, mass spectrometry, nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS.

Liste des abréviations

1D-PAGE	électrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide
2-DE	électrophorèse bidimensionnelle
2D-DIGE	électrophorèse bidimensionnelle différentielle
2D-PAGE	électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide
ACN	acétonitrile
Actine F	actine filamenteuse
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AP	phosphatase alcaline
ARNm	acide ribonucléique messenger
BCEC	cellule endothéliale de capillaires cérébraux
BHE	barrière hémato-encéphalique
CE	cellule endothéliale
CHCA	acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
DJ-1	homologue 7 de la protéine de la maladie de Parkinson, PARK7
EHD1	protéine 1 contenant un domaine d'homologie à Eps15
FDR	<i>false discovery rate</i>
GO	<i>gene ontology</i>
HPLC	chromatographie liquide haute performance
ICAT	<i>isotope-coded affinity tags</i>
ICPL	<i>isotope-coded protein label</i>
IEF	isoélectrofocalisation
IT	trappe ionique
LC	chromatographie liquide
LCR	liquide céphalo-rachidien
LDL	lipoprotéine de basse densité
Lim. BBB	BCECs possédant un phénotype BHE limité
LY	jaune lucifer
MALDI	ionisation/désorption laser assistée par matrice
MM	masse moléculaire
MPT	modification post-traductionnelle
MS	spectrométrie de masse
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem ou fragmentation
m/z	masse sur charge
PANTHER	<i>protein analysis through evolutionary relationships</i>
PFF	<i>peptide fragmentation fingerprint</i>
pH	potentiel hydroxyde/hydrogène
pI	point isoélectrique
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
PRIDE	base de données d'identifications protéomiques
P-gp	P-glycoprotéine
RE	réticulum endoplasmique
Re-ind. BBB	BCECs possédant un phénotype BHE ré-induit
ROS	espèce réactive d'oxygène

RT-PCR	transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SNC	système nerveux central
SODC	superoxyde dismutase 1, SOD1
TEER	résistance électrique trans-endothéliale
TFA	acide trifluoroacétique
TfR	récepteur de la transférine
TNAP	phosphatase alcaline tissu-non spécifique, ALPL
TOF	temps de vol
UNGV	unité neuro-glio-vasculaire
γ -GT	γ -glutamyl transpeptidase
ZO	<i>zonula occludens</i>

Présentation du travail de thèse

Parmi les fluides biologiques de notre organisme, le sang est sans nul doute l'un des plus importants. Grâce aux cellules qu'il contient, leucocytes, plaquettes et hématies, le sang participe, entre autres, aux mécanismes de défense, à l'hémostase et au transport des gaz tels que le dioxygène et le dioxyde de carbone. Il comprend également différents composés qui seront acheminés vers chacun de nos organes. On y retrouve des nutriments issus de la digestion (acides aminés, peptides, acides gras, lipoprotéines, glucose, ions, vitamines), des électrolytes, des hormones, du cholestérol, et même des médicaments, liés ou non à des protéines sériques. Le sang participe également à l'élimination et au recyclage des déchets métaboliques. De par ses rôles variés, il constitue par excellence le milieu d'échanges cellulaires et moléculaires entre les tissus. Ces échanges ont plus précisément lieu au niveau des capillaires, les plus petits vaisseaux sanguins où la pression sanguine est la plus faible. De manière générale, qu'ils soient continus ou discontinus, les capillaires, constitués de cellules endothéliales (CEs) organisées en monocouches, sont perméables. Cette perméabilité est à la fois paracellulaire et transcellulaire de par la présence de fenestrations, de vésicules de pinocytose et d'autres mécanismes de transport moléculaire. Elle est en partie régulée par les tissus environnants, comme au niveau du foie, des reins et du cerveau.

Notre cerveau est un organe richement vascularisé puisqu'il contient pas moins de 650 km de capillaires (Zlokovic, 2008). Les travaux de Paul Ehrlich (1885) approfondis par ceux d'Edwin Goldman (1913) ont démontré l'existence d'une barrière empêchant le passage d'un colorant hydrophile du sang vers le cerveau et inversement. Cette barrière fut naturellement qualifiée de barrière hémato-encéphalique (BHE) en 1921 par Stern et Gautier (Stern and Gautier, 1922). Cette dernière est localisée au niveau des CEs des capillaires cérébraux (BCECs) qui constituent un endothélium de type continu. Ces cellules, organisées en monocouche, reposent sur une membrane basale dans laquelle sont enchâssés des péricytes. Contrairement aux capillaires périphériques, les BCECs sont entourées par un manchon ininterrompu de pieds astrocytaires, eux-mêmes au contact des neurones. Cette organisation cellulaire est nommée unité neuro-glio-vasculaire (UNGV). Cet environnement, et notamment **la proximité des astrocytes** (Descamps *et al.*, 2003; Haseloff *et al.*, 2005), induit un phénotype particulier (le phénotype BHE) rendant les BCECs particulièrement imperméables au passage de nombreuses molécules vers le compartiment cérébral. Ainsi, 95 % des composés thérapeutiques à visée cérébrale s'avèrent inefficaces *in vivo* car incapables de rejoindre le compartiment cérébral du fait du phénotype de BHE de ces CEs. Compte tenu de la progression des maladies neurologiques, neurodégénératives et vasculaires, il devient important de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'établissement et du maintien de ce phénotype et d'en appréhender les règles de régulation.

Dans une cellule, les informations fournies par l'analyse du génome, des transcrits ou par l'analyse des protéines sont complémentaires (Calabria and Shusta, 2006). Alors que les approches génomiques et transcriptomiques présentent de nombreux avantages, ni le décryptage du génome, ni l'analyse à grande échelle des transcrits ne permet à l'heure actuelle de prédire le taux d'expression des protéines en raison des mécanismes moléculaires de régulation de la transcription et de la traduction. Ces approches ne permettent pas non plus de préciser la localisation intracellulaire des protéines ou leurs modifications post-traductionnelles (MPTs). Dès lors, puisque les modifications du phénotype des CEs cérébrales sont la conséquence des variations protéiques au sein de ce tissu, il nous semblait plus opportun d'identifier en priorité **les protéines impliquées dans l'établissement et le maintien du phénotype BHE.**

Les BCECs, support anatomique de la BHE, font l'objet de nombreuses recherches. De par leur place privilégiée, beaucoup de ces recherches sont orientées vers l'étude des protéines de la membrane plasmique compte tenu du rôle majeur des protéines des jonctions serrées, des récepteurs ou encore des transporteurs spécifiques dans le phénotype BHE. Au contraire, très peu de recherches portent sur les protéines cytoplasmiques, pourtant essentielles dans les cascades de signalisation ou encore dans la mise en place des propriétés de barrière. Le premier chapitre de l'étude bibliographique de ce manuscrit, consacré aux diverses connaissances relatives à la BHE, souligne cette constatation. Le deuxième chapitre de l'étude bibliographique concerne quant à lui les différents modèles de BHE pour l'étude des protéines.

A l'aide du modèle *in vitro* de BHE mis au point au laboratoire de physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique du Professeur Roméo CECHELLI, l'objectif de ce travail a été de mettre en évidence des protéines cytoplasmiques induites par les cellules gliales (comprenant les astrocytes) au sein des BCECs. La présentation des diverses techniques protéomiques utilisables pour une analyse globale des protéines fait l'objet du dernier chapitre de l'étude bibliographique.

Afin de répondre aux objectifs fixés, nous avons analysés les protéines « cytoplasmiques » des BCECs cultivées seules ou en présence de cellules gliales grâce à une extraction spécifique des protéines par du Triton X-100 suivie de leur fractionnement par gradient en solvant organique. L'identification des protéines repose sur l'analyse par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF/TOF-MS des peptides tryptiques générés. Nous avons tout d'abord opté pour une analyse booléenne (absence/présence) des protéines « cytoplasmiques » issues des BCECs solo ou co-cultivées puis pour une analyse quantitative de ces protéines grâce à un marquage isotopique. *In fine*, ces deux types d'analyses se sont révélés extrêmement complémentaires. Le manuscrit se termine par une discussion générale comprenant les différentes conclusions et perspectives émanant de ces travaux.

La découverte de nouvelles molécules impliquées ou résultantes de l'induction et du maintien du phénotype BHE au sein des BCECs permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de ce phénotype mais également d'envisager de nouvelles stratégies permettant d'améliorer le passage transcérébral d'agents thérapeutiques.

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Professeur Yannis KARAMANOS et du Docteur Christophe FLAHAUT au sein du Laboratoire de la barrière hémato-encéphalique (LBHE, EA 2465, Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean PERRIN, rue Jean SOUVRAZ, SP 18, 62307 LENS cedex) dirigé par le Professeur Roméo CECHELLI. Il a été financé par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (MESR) par l'intermédiaire d'une allocation de Recherche.

Les résultats obtenus lors de cette thèse ont été publiés et/ou communiqués, oralement et par affiche, lors de congrès nationaux et internationaux.

Nos recherches ont fait l'objet des publications suivantes :

TNAP and EHD1 are over-expressed in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties.

Deracinois B, Duban-Deweere S, Pottiez G, Cecchelli R, Karamanos Y, Flahaut C. (2012), *PLoS one*, 7(10) : e48428.

Glial-cell-mediated re-induction of the blood-brain barrier phenotype in brain capillary endothelial cells: a differential gel electrophoresis study.

Deracinois B, Pottiez G, Chafey P, Teerlink T, Camoin L, Broussard C, Couraud PO, Cecchelli R, Karamanos Y and Flahaut C.

En révision dans *Proteomics*.

A differential proteomic approach identifies structural and functional components that contribute to the differentiation of brain capillary endothelial cells.

Pottiez G, Duban-Deweere S, **Deracinois B**, Gosselet F, Camoin L, Hachani J, Couraud PO, Cecchelli R, Dehouck MP, Fenart L, Karamanos Y, Flahaut C. (2011), *Journal of Proteomics*, 75(2) : 628-41.

A large-scale electrophoresis- and chromatography-based determination of gene expression profiles in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties.

Pottiez G, **Deracinois B**, Duban-Deweere S, Cecchelli R, Fenart L, Karamanos Y, Flahaut C. (2010), *Proteome Science*, 8 : 57.

Proteomic Analysis of Plasma Membrane Proteins in an *in vitro* Blood-Brain Barrier Model. Duban-Deweere S, Hachani J, **Deracinois B**, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y. (2012), *Proteomics - Human Diseases and Protein Functions*, ISBN : 978-953-307-832-8, 391-416.

Nos recherches ont fait l'objet des communications suivantes :

Proteomics of the blood-brain barrier endothelial cells: fractionated solubilisation and LC MS/MS using label free and stable isotope labeling approaches.

Deracinois B*, Duban-Deweere S, Hachani J, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y. (* orale) *9th Cerebral Vascular Biology International Conference*, 21-25 juin 2011, Leiden, Pays-Bas.

Etude protéomique différentielle *label free* par nano-LC MS/MS pour une meilleure compréhension du phénotype Barrière Hémato-Encéphalique.

Deracinois B*, Duban-Deweere S, Hachani J, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y. (* orale) *Réunion annuelle « Dementia in Neurological and Mental Disease » (DN2M)*, 5 novembre 2010, Lille, France.

Etude protéomique *label free* pour une meilleure compréhension du phénotype BHE.

Deracinois B*, Duban-Deweere S, Hachani J, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y. (* orale) *Club-jeunes de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (cj-SFEAP)*, 6 septembre 2010, Marseille, France. [Obtention d'une bourse afin d'assister au congrès.](#)

Analyse comparative du sous-protéome cytoplasmique de la barrière hémato-encéphalique : approche sans marquage et approche par marquage isotopique stable.

Deracinois B, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y. *Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (SFEAP)*, 15-17 octobre 2012, Rouen, France. [Obtention d'une bourse afin d'assister au congrès.](#)

Analyse comparative du sous-protéome cytoplasmique de la Barrière Hémato-Encéphalique : approche *label free* et approche par marquage isotopique stable.

Deracinois B, Duban-Deweere S, Hachani J, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y. *11^{ème} journée André Verbert, colloque annuel des doctorants*, 15 septembre 2011, Lille, France et *Congrès de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP)*, 19-22 septembre 2011, Avignon, France.

Proteomics of blood-brain barrier endothelial cells: fractionated solubilisation and LC MS/MS using label free and stable isotope labeling approaches.

Deracinois B, Duban-Deweere S, Hachani J, Cecchelli R, Karamanos Y, Flahaut C. *HUPO 2011*, 4-7 septembre 2011, Genève, Suisse.

Etude protéomique différentielle par nano-LC MS/MS pour une meilleure compréhension du phénotype Barrière Hémato-Encéphalique.

Deracinois B, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y. *14th Annual Meeting of the LARC-Neuroscience*, 29 octobre 2010, Lille, France. [Prix de la meilleure communication.](#)

Proteomic analysis of plasma membrane proteins in an in vitro blood-brain barrier model.

Hachani J, **Deracinois B**, Flahaut C, Karamanos Y, Cecchelli R, Duban-Deweere S.

HUPO 2011, 4-7 septembre 2011, Genève, Suisse

et 4th EuPA Scientific Meeting, 23-27 octobre 2010, Estoril, Portugal.

Etude protéomique *label free* pour une meilleure compréhension du phénotype BHE.

Deracinois B, Duban-Deweere S, Hachani J, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y.

27^e congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (SFEAP), 6-8 septembre 2010, Marseille, France. [Obtention d'une bourse afin d'assister au congrès.](#)

Etude protéomique différentielle *label free* par nano-LC MS/MS pour une meilleure compréhension du phénotype barrière hémato-encéphalique.

Deracinois B, Duban-Deweere S, Hachani J, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y.

Réunion annuelle de la Société d'Etude des Interfaces "Sang-Cerveau" (S.E.I.S.C.), 31 mai 2010, Paris, France.

Label free differential proteomic study by off line 1D-LC MS/MS to a better defining of blood brain barrier phenotype.

Deracinois B, Pottiez G, Duban-Deweere S, Cecchelli R, Karamanos Y, Flahaut C.

Congrès de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP), 14-17 septembre 2009, Dijon, France.

D'autres communications ont été présentées :

Club-Jeunes de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (cj-SFEAP).

Deracinois B*, Arc E, Lennon S, Trauchessec M, Aurand R. (* orale)

7^{ème} journée protéomique « Protéomique clinique et pharmaceutique », Proté'Asso, 27 janvier 2012, Lille, France.

Club-jeunes de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (cj-SFEAP).

Tonini L, **Deracinois B**, Lennon S, Plumel M, Panchout F, Trauchessec M.

Congrès de la Société Française d'Électrophorèse et d'Analyse Protéomique (SFEAP), 15-17 octobre 2012, Rouen, France.

8^e journées du Club-Jeunes de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (cj-SFEAP).

Trauchessec M, **Deracinois B**, Arc E, Lennon S, Aurand R.

8^e journées du cj-SFEAP, 6-8 juin 2012, Arras, France.

Club-jeunes de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (cj-SFEAP).

Aurand R, **Deracinois B**, Arc E, Lennon S, Morel P, Trauchessec M, Petiot S, Couvet M, Delaunois B, Boursier C.

Congrès de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP), 19-22 septembre 2011, Avignon, France.

Première partie
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

**Pourquoi et comment étudier les
protéines cytoplasmiques des cellules
endothéliales de la barrière
hémato-encéphalique ?**

Chapitre I

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux : support anatomique de la barrière hémato-encéphalique (BHE)

Sommaire

1. Caractéristiques générales de la BHE.....	- 23 -
1.1. Localisation et environnement cellulaire.....	- 23 -
1.2. Phénotype associé à la fonction de BHE	- 24 -
1.3. Induction et maintien des propriétés de barrière.....	- 26 -
2. Complexe jonctionnel intercellulaire.....	- 29 -
2.1. Restriction de la perméabilité paracellulaire	- 29 -
2.2. Protéines membranaires du complexe jonctionnel	- 30 -
2.3. Protéines cytoplasmiques associées au complexe jonctionnel.....	- 31 -
3. Transporteurs et récepteurs au service d'une barrière sélective	- 32 -
3.1. Mécanismes d'efflux	- 33 -
3.2. Transport des nutriments	- 34 -
3.3. Stratégies de vectorisation.....	- 37 -
4. Enzymes de la barrière métabolique.....	- 39 -
4.1. Enzymes de la membrane plasmique	- 39 -
4.2. Enzymes cytoplasmiques.....	- 40 -
5. Protéines et mécanismes cytoplasmiques	- 40 -
5.1. Cytosquelette.....	- 41 -
5.2. Organites	- 43 -
5.3. Transduction du signal.....	- 44 -

Afin de maintenir un milieu optimal pour le fonctionnement neuronal, le système nerveux central (SNC) est isolé du reste de l'organisme par deux systèmes biologiques indépendants : la barrière épithéliale hémato-liquidienne (BHL) et la barrière endothéliale hémato-encéphalique (BHE). La BHL, localisée au niveau des plexus choroïdes (production du liquide céphalo-rachidien (LCR)) et des villosités arachnoïdiennes (résorption du LCR), permet la régulation des échanges entre le sang et le LCR (non détaillée dans ce manuscrit, pour revue, Segal, 2000). La BHE, d'une longueur de 650 kilomètres pour une surface 5 000 fois supérieure à la BHL, est localisée au niveau des cellules endothéliales (CEs) des capillaires cérébraux (BCECs) et constitue une interface, à la fois physique et métabolique, entre le sang et le compartiment cérébral (Reese and Karnovsky, 1967). En contrôlant les échanges cellulaires et moléculaires entre le sang et le cerveau, la BHE est garante de l'homéostasie cérébrale et de la protection du cerveau vis à vis des fluctuations, physiologiques ou pathologiques, de la concentration des composés sanguins.

En raison de ce phénotype de BHE développé par les BCECs, 100 % des molécules de haute masse moléculaire (MM) et plus de 98 % des molécules de faible MM (dont les médicaments à visée cérébrale), bien qu'actifs sur le tissu nerveux *in vitro*, sont inefficaces *in vivo* car incapables de rejoindre le compartiment cérébral (Pardridge, 2007). La BHE semble être impliquée dans de nombreuses pathologies et troubles neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie, la sclérose en plaques ou encore les accidents vasculaires cérébraux (Zlokovic, 2008). Dès lors, afin d'améliorer l'acheminement des médicaments vers le compartiment cérébral et de lutter contre ces maladies, il devient urgent de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'établissement et du maintien du phénotype de BHE.

Ce premier chapitre de l'étude bibliographique propose un résumé des caractéristiques de ce phénotype endothélial unique, associé à la complexité du fonctionnement cérébral.

1. Caractéristiques générales de la BHE

1.1. Localisation et environnement cellulaire

Les BCECs sont le support anatomique de la BHE. Elles se répartissent sous la forme d'une monocouche continue organisée en tube de cellules jointives, autour de la lumière des capillaires. Cette monocouche est cerclée d'une membrane basale dans laquelle des péricytes sont enchâssés (sur la face abluminale). Cet ensemble cellulaire à proximité des neurones est lui-même entouré d'un manchon ininterrompu de pieds astrocytaires (prolongements pédicellaires des astrocytes) qui occupe plus de 85 % de la surface des capillaires. Les cellules

vasculaires au contact de ces cellules nerveuses forment ainsi l'unité neuro-glio-vasculaire (UNGV) (Figure 1).

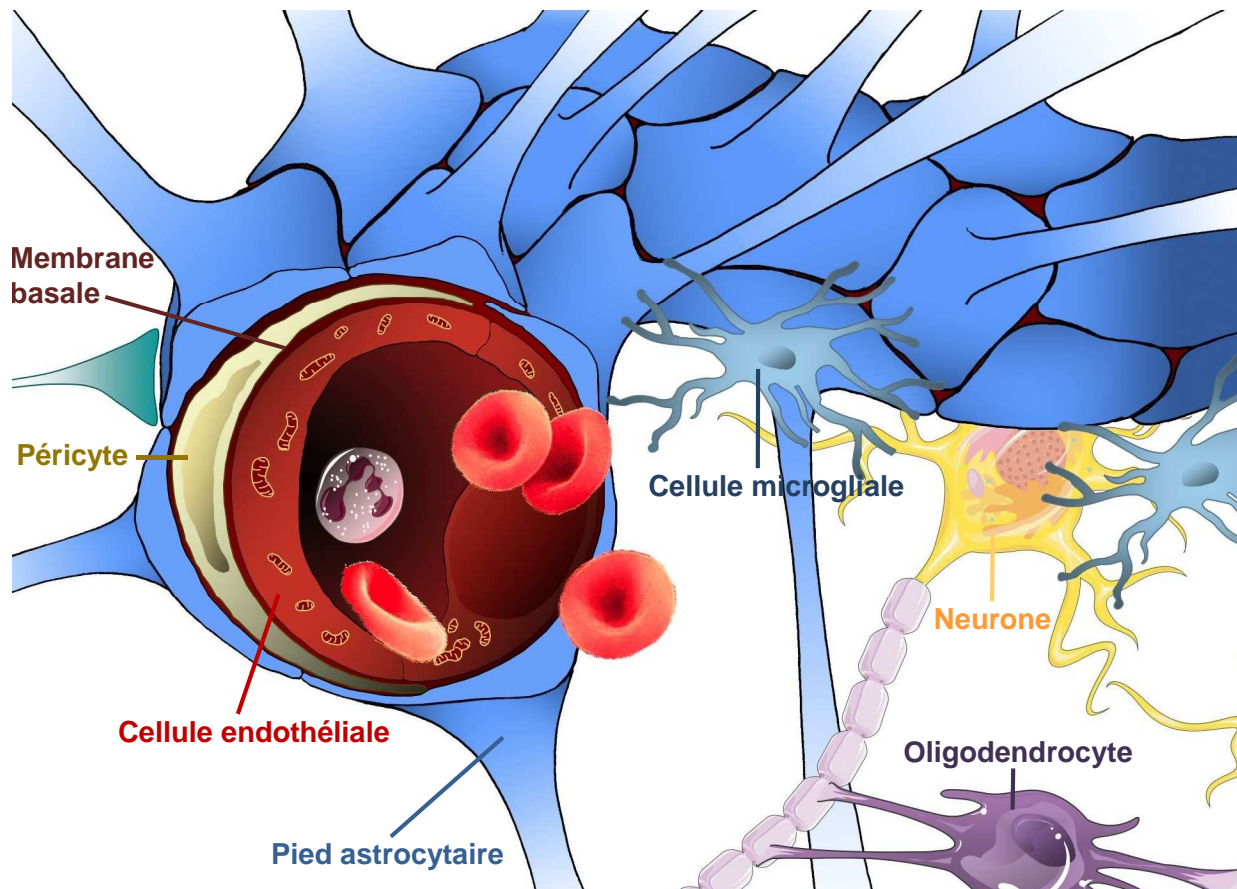


Figure 1 : L'unité neuro-glio-vasculaire.

Schéma d'une coupe transversale d'un capillaire cérébral présentant la localisation de la barrière hémato-encéphalique avec la monocouche de CE qui délimite la lumière du capillaire, la membrane basale dans laquelle un péricyte est enchâssé et le manchon continu de pieds astrocytaires entourant le tout. L'UNGV est le fruit d'une coopération cellulaire : les cellules vasculaires représentées par les **cellules endothéliales** des vaisseaux cérébraux associées aux **péricytes** et les cellules nerveuses représentées par les **cellules gliales** (cellules microgliales, oligodendrocytes et astrocytes) et les **neurones**. Illustration adaptée de l'iconographie du laboratoire.

1.2. Phénotype associé à la fonction de BHE

Un des rôles principaux de la BHE est de contrôler la perméabilité vasculaire cérébrale afin de maintenir l'homéostasie cérébrale et de protéger le cerveau des composés potentiellement néfastes véhiculés par le sang. Ainsi, contrairement aux CE des capillaires périphériques, où les voies de transports moléculaires au travers de l'endothélium sont nombreuses, les BCECs, grâce à leur environnement, développent un phénotype particulier responsable d'un transport sélectif. Ce phénotype de BHE confère aux CE cérébrales la propriété de filtre moléculaire qui s'exprime par plusieurs caractéristiques morphologiques (Figure 2) :

- elles sont polarisées (composition biochimique différente des membranes luminale et abluminale) ;
- elles sont riches en mitochondries ;
- elles possèdent une résistance électrique trans-endothéliale élevée (TEER) liée à la présence de jonctions intercellulaires spécifiques (les jonctions serrées) qui restreignent le mouvement paracellulaire des ions ;
- elles possèdent une faible perméabilité paracellulaire aux petites molécules hydrophiles liée également à la présence de ces jonctions intercellulaires spécifiques et à une absence de fenestration ;
- elles possèdent un flux transcellulaire limité lié à une faible densité de vésicules d'endocytose (Begley and Brightman, 2003) ainsi qu'à l'absence de canaux transendothéliaux (Balin *et al.*, 1987; Reese and Karnovsky, 1967) ;
- elles présentent des voies de transport transcellulaire régulées et spécifiques, le passage au travers de ces cellules se faisant principalement *via* des transporteurs et des récepteurs protéiques spécifiques.

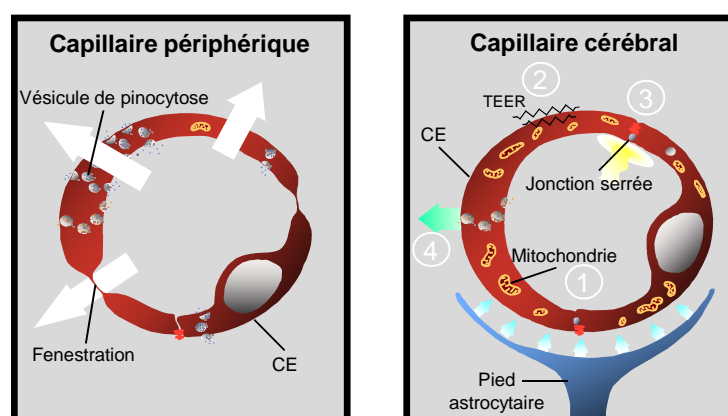


Figure 2 : Comparaison des caractéristiques morphologiques des capillaires périphériques et des capillaires cérébraux.

Les CEs des capillaires périphériques (à gauche) possèdent des fenestrations ainsi que de nombreuses vésicules de pinocytose. A proximité des astrocytes, les BCECs (à droite) sont quant à elles riches en mitochondries (1) et présentent des jonctions intercellulaires responsables d'une TEER élevée (2) et d'un passage paracellulaire restreint (3). Le passage au travers de ces CE se fait principalement *via* des récepteurs et des transporteurs spécifiques (4). CE, cellule endothéliale ; TEER, résistance électrique trans-endothéliale. Illustration adaptée de l'iconographie du laboratoire.

La plupart de ces caractéristiques font de la BHE une barrière physique. A cette barrière physique s'ajoute une barrière métabolique (Betz *et al.*, 1980). En effet, on retrouve des enzymes de détoxification telles que la monoamine oxydase et la γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) ainsi que des protéines d'efflux moléculaire, telles que la P-glycoprotéine (P-gp) et les

multidrug resistance-associated proteins (MRP) destinées à réexpédier vers la circulation sanguine certaines molécules exogènes.

De nombreuses protéines de ce type, fortement exprimées au niveau des CEs au phénotype de BHE, sont ainsi connues pour être des marqueurs de celle-ci (Abbott *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007a).

1.3. Induction et maintien des propriétés de barrière

L'UNGV est une unité interactive fonctionnelle regroupant plusieurs types cellulaires autour des BCECs. *In vivo* comme *in vitro*, les interactions entre ces cellules sont indispensables au développement, au maintien et à la réparation après lésion de la fonction de BHE endothéliale.

1.3.1. Astrocytes

Les astrocytes représentent 90 % de la masse cérébrale (Gee and Keller, 2005). Ils appartiennent, avec les oligodendrocytes et la microglie, au tissu glial. Ils sont surtout connus pour leur rôle nourricier des neurones et de régulation du taux extracellulaire d'ions K^+ qui s'accumulent dans l'espace extracellulaire au cours de l'activité neuronale. Ils assurent également l'homéostasie de l'eau et des neurotransmetteurs du cerveau.

La présence des astrocytes fibrillaires est connue comme le paramètre le plus important dans l'établissement et le maintien des caractéristiques des BCECs (Hawkins and Davis, 2005). En effet, l'observation de l'arbre microvasculaire cérébral montre que les astrocytes émettent de nombreux prolongements formant un manchon continu autour des vaisseaux. Un astrocyte peut être au contact de plusieurs CEs et une CE peut être en contact de plusieurs astrocytes. De plus, au cours du développement, l'établissement de la BHE coïncide avec la formation de ces manchons astrocytaires et de la membrane basale autour des capillaires cérébraux (Delorme *et al.*, 1968; Wolff and Bar, 1972). De nombreuses études *in vitro*, basées sur la culture de CEs cérébrales en présence d'astrocytes ou de milieu conditionné d'astrocytes, ont permis de mettre en exergue la capacité de ces cellules à induire les propriétés de BHE (Berezowski *et al.*, 2004a; DeBault, 1981; DeBault and Cancilla, 1980; Dehouck *et al.*, 1990; Fenart *et al.*, 1998; Maxwell *et al.*, 1987; Raub *et al.*, 1992; Roux *et al.*, 1994; Rubin *et al.*, 1991; Tontsch and Bauer, 1991; Wolburg *et al.*, 1994). Dans plusieurs de ces modèles, les astrocytes ne sont pas au contact direct des CEs, laissant suggérer que les astrocytes sécrètent des facteurs solubles responsables de l'établissement des propriétés de BHE. Cette hypothèse est maintenant confirmée. Il existe même des échanges réciproques entre les astrocytes et les CEs qui s'avèrent indispensables à l'élaboration, au maintien et également à la protection du phénotype BHE (pour revues, Abbott *et al.*, 2006; Liebner *et al.*, 2011).

1.3.2. Péricytes

Les péricytes sont des cellules périvasculaires aux propriétés contractiles proches des cellules musculaires lisses. Ils sont associés aux lits capillaires de tout l'organisme avec cependant un ratio péricyte/CE différent selon le tissu. Celui-ci est élevé au niveau des barrières hémato-tissulaires, allant de 1 pour 1 au niveau de la rétine, 1 pour 3 au niveau cérébral, et beaucoup plus faible (1 pour 100 au niveau du muscle squelettique) au niveau des autres capillaires (Bonkowski *et al.*, 2011; Shepro and Morel, 1993; Tilton *et al.*, 1985). Ils sont localisés du côté abluminal des CEs, entièrement enchâssés dans un dédoublement de la membrane basale, et émettent de nombreux prolongements cytoplasmiques encerclant approximativement 22 à 32 % du capillaire. Leur proximité cellulaire de 20 nm avec les CEs suggère leur implication dans la physiologie des capillaires cérébraux, implication pourtant longtemps négligée en l'absence de marqueurs cellulaires fiables (Allt and Lawrenson, 2001; Bonkowski *et al.*, 2011). Leur identification est principalement basée sur leur localisation, leur morphologie et certaines propriétés, cependant il est possible de différencier les péricytes cérébraux des cellules musculaires lisses grâce à leur activité γ -GT élevée (Vandenhoute *et al.*, 2011).

L'absence de péricytes dans des souris déficientes entraîne des lésions cérébrales vasculaires (Bell *et al.*, 2010). Bien que certains travaux montrent que les péricytes ne semblent pas ou peu influencer l'expression de marqueurs spécifiques à la BHE, de plus en plus d'auteurs suggèrent que ces cellules auraient une influence importante sur les CEs. Les péricytes permettraient de restreindre le transport vésiculaire, en désorganisant la polarité astrocytaire et en inhibant la prolifération des CEs (Armulik *et al.*, 2010; Hellstrom *et al.*, 2001). D'autres études montrent que les péricytes sont capables de réduire la perméabilité endothéliale pour de petites molécules hydrophiles (utilisées comme marqueurs d'intégrité : jaune lucifer et fluorescéine), d'augmenter la TEER et/ou d'induire l'expression de protéines de jonctions serrées (occludine, claudine 5 et *zonula occludens* (ZO-1)) (Nakagawa *et al.*, 2009; Vandenhoute *et al.*, 2011). Les CEs seraient capables de réguler le flux sanguin microvasculaire par la sécrétion d'endothéline-1 provoquant la contraction des péricytes (Dehouck *et al.*, 1997a). Ils joueraient également un rôle primordial dans la formation de la BHE pendant le développement embryonnaire (Daneman *et al.*, 2010). Par ailleurs, lors d'une rupture de la BHE, les péricytes pourraient, grâce à leur propriété de phagocytose, protéger le cerveau de l'entrée de composés toxiques (Balabanov and Dore-Duffy, 1998).

1.3.3. Neurones

La microcirculation cérébrale est fortement sensible aux besoins du tissu qu'elle approvisionne et notamment des neurones qui ont une activité et des besoins métaboliques spécifiques. L'implication des neurones au sein de l'UNGV a également été longtemps négligée

malgré la proximité évidente de ces cellules avec les CEs (Bauer and Bauer, 2000). Il est estimé que chaque neurone possède son propre capillaire (Girouard and Iadecola, 2006) supposant donc une étroite relation neurone/CE. De manière générale, il est considéré que les astrocytes jouent le rôle d'intermédiaire entre les CEs et les neurones (Koehler *et al.*, 2009; Nedergaard *et al.*, 2003; Zonta *et al.*, 2003).

Lors du développement embryonnaire, la neurogenèse et la formation des jonctions serrées des CEs précèdent la gliogenèse (Daneman *et al.*, 2010; Tam and Watts, 2010). Dès lors, on suspecte que les neurones et/ou des cellules progénitrices cérébrales initieraient la formation de ces jonctions serrées. De plus, certaines études *in vitro* soulignent que les neurones ou des progéniteurs neuraux permettraient l'induction de l'activité de la γ -GT (supérieure à celle induite par les astrocytes) et de l'expression de l'occludine (protéine des jonctions serrées), la diminution de la perméabilité paracellulaire et l'augmentation de la TEER (Schiera *et al.*, 2005; Tontsch and Bauer, 1991; Weidenfeller *et al.*, 2007). Une nouvelle séquence d'événements menant à la formation de la BHE a été récemment proposée (Daneman *et al.*, 2010) : (i) les progéniteurs neuraux seraient les premières cellules à intervenir lors de l'angiogenèse embryonnaire en induisant certaines protéines spécifiques de la BHE au niveau des BCECs (notamment des protéines des jonctions serrées et des transporteurs) ; (ii) les péricytes permettraient par la suite de renforcer ces propriétés en régulant la structure des jonctions serrées et en limitant la transcytose ; (iii) les astrocytes interviendraient en dernier afin d'achever la formation de la BHE et maintenir ses propriétés après la naissance.

1.3.4. Membrane basale

Les CEs assurent la production, avec l'aide des péricytes et des astrocytes, de la membrane basale. La membrane basale est un réseau extracellulaire continu d'une fine épaisseur de 30 à 40 nm, composé essentiellement de collagène de type IV, de laminine et de fibronectine. Elle joue un rôle de support physique aux cellules mais également de filtre sélectif par son réseau tridimensionnel et ses charges anioniques (protéoglycanes et glycoprotéines).

Comme démontré dans une étude *in vitro*, la membrane basale est importante pour la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire et le maintien du phénotype des CEs (Tilling *et al.*, 1998). L'interaction membrane basale-CE se fait par l'intermédiaire de molécules d'adhésion, principalement les intégrines. Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui interagissent, côté cytoplasmique, avec des protéines adaptatrices qui les lient au cytosquelette. Cette interaction permet alors une régulation des voies de transduction du signal en réponse à des stimuli (chimiques ou physiques) permettant un contrôle direct de cette adhésion. La membrane basale permet également la communication et la signalisation entre les différents types cellulaires. Lors de manifestations pathologiques à l'origine de la rupture de la

BHE, une perte de stabilité de la membrane basale est fréquemment observée sous l'effet de certaines métalloprotéases (Gasche *et al.*, 2006) montrant ainsi sa réelle importance au sein de la BHE.

2. Complexe jonctionnel intercellulaire

2.1. Restriction de la perméabilité paracellulaire

Les BCECs établissent entre elles un complexe jonctionnel incluant des jonctions serrées (*zonula occludens*) et des jonctions adhérentes (*zonula adherens*) qui s'organisent et se succèdent dans un ordre précis à partir de la lumière du capillaire (Figure 3). La BHE a ainsi pu être localisée au niveau des capillaires grâce à la mise en évidence, par microscopie électronique, des protéines de jonctions serrées entre les BCECs (Reese and Karnovsky, 1967).

Ce complexe jonctionnel est représenté à la fois par des protéines transmembranaires mais également par des protéines cytosoliques associées et par le réseau d'actine intracellulaire (Hawkins and Davis, 2005; Huber *et al.*, 2001; Wolburg and Lippoldt, 2002; Wolburg *et al.*, 1994). Ainsi, il permet de lier les cellules entre elles de façon « quasi hermétique », restreignant la diffusion paracellulaire des petites et grosses molécules hydrophiles (Bazzoni and Dejana, 2004). Le complexe jonctionnel intervient également dans la polarisation des CEs, limitant la libre circulation des lipides et des protéines entre les surfaces cellulaires apicale et basolatérale dont les constituants membranaires sont différents. Cette polarisation cellulaire est importante afin d'assurer le transport orienté de substances de la lumière du capillaire vers le parenchyme cérébral et inversement. Une modification de cette polarisation par un remaniement des constituants membranaires est ainsi retrouvée dans certains cas pathologiques. Ce complexe jonctionnel est ainsi un complexe dynamique où les jonctions s'associent et se dissocient en réponse à des stimuli physiologiques ou pathologiques.

Les jonctions serrées sont situées dans la zone la plus apicale (luminale). Elles permettent de restreindre la diffusion des ions (Hansen *et al.*, 1977) et de limiter le passage des molécules non électrolytes hydrophiles (Oldendorf, 1971a; Oldendorf, 1971b). Les propriétés résultantes de l'établissement de ces jonctions serrées confèrent à l'endothélium une TEER élevée et une faible perméabilité paracellulaire (Huber *et al.*, 2001). Les jonctions serrées sont régulées *via* des signaux intracellulaires mais elles transmettent également des informations vers l'intérieur de la cellule en réponse à l'environnement cérébral, dans le but de réguler l'expression de gènes responsables de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Dejana and Giampietro, 2012; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008; Terry *et al.*, 2010; Wolburg *et al.*, 2009).

Les jonctions adhérentes ont un rôle dans l'initiation et la stabilisation de l'adhésion cellule-cellule, dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine et dans la régulation de la signalisation intracellulaire.

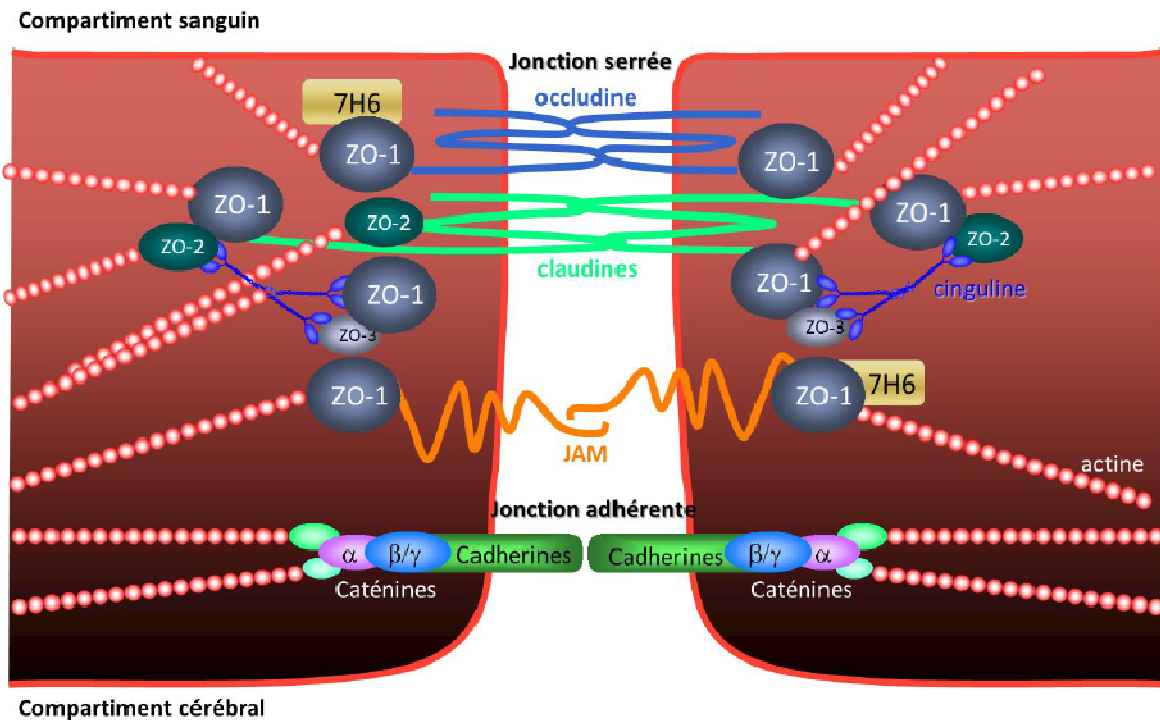


Figure 3 : Schéma simplifié représentant les principales protéines (membranaires et cytoplasmiques) impliquées dans le complexe jonctionnel intercellulaire.

Le squelette des jonctions serrées est constitué de protéines que l'on peut diviser en deux catégories : les protéines membranaires dimérisées avec les homologues de la cellule adjacente (claudines et occludine) et les protéines cytoplasmiques adaptatrices qui sont liées à ces protéines membranaires (telles que les protéines *zonula occludens* (ZO-1, 2 et 3)) formant la première « couche » ou liées avec d'autres protéines cytoplasmiques (telles que la protéine 7H6 ou la cinguline) formant la deuxième « couche ». L'actine possède des sites de liaison sur les ZOs, l'occludine et les claudines, dont les interactions sont contrôlées par les protéines adaptatrices. Les jonctions serrées reposent également sur une zone de contact intercellulaire, constituée par des molécules d'adhésions telles que les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAMs). Les jonctions adhérentes sont quant à elles formées par les cadhérines membranaires et les caténines cytoplasmiques pour le lien avec le cytosquelette. Illustration adaptée de Abbott *et al.*, 2010 et de l'iconographie du laboratoire.

2.2. Protéines membranaires du complexe jonctionnel

Au niveau des CEs de la BHE, les jonctions serrées sont constituées principalement des claudines 3, 5 (claudine majoritairement exprimée) et 12, de l'occludine et des molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM-A, B, C). Les claudines sont des protéines phosphorylées retrouvées uniquement au niveau des jonctions serrées. La présence de la claudine 1 reste encore controversée alors que les claudines 10 et 22 ont récemment été mises en évidence dans des BCECs murins (Ohtsuki *et al.*, 2008). L'occludine est également une protéine phosphorylée dont le degré de phosphorylation influence sa localisation cellulaire : les formes les moins phosphorylées sont localisées dans la membrane basolatérale, le cytoplasme et les

jonctions serrées alors que les formes les plus phosphorylées sont retrouvées exclusivement au niveau des jonctions serrées (Sakakibara *et al.*, 1997).

Les jonctions adhérentes sont quant à elles constituées principalement de cadhérine-5 appelée *vascular endothelial* (VE)-cadhérine (Dejana and Del Maschio, 1995). La VE-cadhérine est une glycoprotéine exprimée par les CE de l'ensemble du système vasculaire.

2.3. Protéines cytoplasmiques associées au complexe jonctionnel

Les jonctions intercellulaires décrites ci-dessus se composent de protéines membranaires mais également de protéines cytoplasmiques dites d'« échafaudage », qui s'associent ensemble pour offrir un support structural aux jonctions en favorisant leur organisation et leur connexion au cytosquelette d'actine.

Les jonctions serrées sont ainsi composées des phosphoprotéines ZO 1, 2 et 3, 7H6 et AHNAK (pour *neuroblast differentiation-associated protein*) mais également de la cinguline. En condition de stress ou de prolifération, ZO-1 est capable de se délocaliser vers le noyau assurant un rôle de molécule de signalisation (Gottardi *et al.*, 1996). La protéine 7H6 est co-localisée au voisinage des jonctions serrées uniquement lorsqu'elle est phosphorylée.

Les caténines β et γ (ou plakiglobine) font partie des jonctions adhérentes. Elles représentent le lien permettant la communication entre les jonctions serrées et les jonctions adhérentes et également entre le complexe jonctionnel et le cytosquelette d'actine.

L'actine, bien qu'elle ne soit pas définie comme une protéine de jonction, intervient dans la mise en place et le maintien du complexe jonctionnel. L'actine est ainsi reliée aux protéines membranaires des jonctions *via* ces protéines d'« échafaudage ».

La liste de ces protéines associées au complexe intercellulaire est en réalité beaucoup plus longue (le Tableau I en reprend une partie). D'autres protéines ont été décrites comme localisées au niveau des jonctions serrées mais leur rôle n'est pas toujours clairement défini. Cependant, toutes ces protéines semblent servir d'adaptateurs cytoplasmiques des jonctions serrées dans le but de recruter d'autres protéines du cytosquelette, de réguler la contractilité du cytosquelette d'actine, de réguler le trafic vésiculaire ou d'avoir une certaine fonction signalétique.

Tableau I : Composants moléculaires principaux impliqués (ou prédits) dans le complexe jonctionnel intercellulaire.

Jonctions serrées	Protéines membranaires	<i>Claudins 1/3, 5, 10, 12, 22</i> <i>Occludin</i> <i>Adherens junction molecules (JAMs)-1,2,3</i> <i>Endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM)</i> <i>Coxsackie and adenovirus receptor (CAR)</i> <i>Coxsackie-and adenovirus receptor-like membrane protein (CLMP)</i>
	Protéines cytoplasmiques	<i>Zonula occludens (ZO)-1,2,3</i> <i>Cingulin</i> <i>Junction-associated coiled-coil protein (JACOP)</i> <i>Protein associated with lin Seven-1 (Pals1)</i> <i>Pals1-associated tight junction (PATJ)</i> <i>Partitioning defective proteins (PARs)-3,6</i> <i>Membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation of protein-protein interaction domains (MAGI)-1,2,3</i> <i>Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1)</i> <i>7H6 antigen</i> <i>AF-6 protein</i> <i>Tight junction-associated protein 1 (PILT)</i> <i>Neuroblast differentiation-associated protein (AHNAK ou Desmoyokin)</i> <i>E3 ubiquitin protein ligase (Itch)</i> <i>Protein kinase C (PKC)</i> <i>G-protein signaling 5 (RGS5), G-proteins Gαi2 et Gαi3</i> <i>Small GTPases Rab3b et Rab13</i> <i>Calcium dependent serine protein kinase (CASK)</i> <i>ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB)</i> <i>Symplekin</i> <i>Actin, myosin</i>
Jonctions adhérentes	Protéines membranaires	<i>Cadherins, vascular endothelial cadherin (VE)-caderin ou cadherin-5</i> <i>Platelet endothelial cell adhesion molecules-1 (PECAM-1)</i>
	Protéines cytoplasmiques	<i>Catenins α, β, γ (plakiglobin), desmoplakin, p120-catenin</i> <i>Vinculin</i> <i>Annexin 2</i> <i>Endothelial-specific receptor-protein tyrosine phosphatase</i> <i>Density-enhanced phosphatase-1</i> <i>α-actinin, actin</i>

Le complexe jonctionnel intercellulaire se compose de protéines membranaires et de protéines cytoplasmiques (adaptatrices, associées, d'« échafaudage » ou du cytosquelette). Tableau adapté de Abbott *et al.*, 2006; Balda and Matter, 2009 et Itoh and Bissell, 2003.

3. Transporteurs et récepteurs au service d'une barrière sélective

Des mécanismes particuliers au sein de la BHE ont été mis en place afin de protéger le cerveau des composés toxiques tout en permettant les échanges vitaux entre le sang et le cerveau. Ces mécanismes regroupent des transporteurs et des récepteurs spécifiques en fonction de l'entrée dans le cerveau ou de la sortie vers la circulation sanguine des molécules.

3.1. Mécanismes d'efflux

Le SNC n'est pas capable de se régénérer facilement en cas de dommages. Afin de se protéger des molécules potentiellement dangereuses, la CE possède des pompes et des transporteurs d'efflux qui vont assurer la protection et la détoxification du SNC, respectivement en limitant l'entrée ou en facilitant la sortie de ces molécules. Ce système d'efflux membranaire participe ainsi au transport de molécules endogènes ou exogènes (Cordon-Cardo *et al.*, 1989). Ces pompes sont divisées en plusieurs familles et sous-familles.

Les transporteurs à *ATP-binding cassette* (ABC) sont la famille la plus importante au niveau de la BHE. Elle possède sept sous-familles, de ABCA à ABCG (Moitra and Dean, 2011). Ces transporteurs vont permettre le transport actif et unidirectionnel d'un grand nombre de substances biologiques comme des peptides, des protéines (hormones), des sucres et des ions, mais également de substances toxiques comme des métaux lourds et des médicaments. Les principales pompes d'efflux impliquées dans les propriétés de barrière de la BHE sont les *multidrug resistance proteins* (MDRs) de la sous-famille ABCB avec la protéine ABCB1 ou P-gp, les *MDR-associated proteins* (MRPs) de la sous-famille ABCC et la *breast cancer resistance protein* (BCRP) de la sous-famille ABCG. L'expression de la P-gp serait principalement retrouvée sur la face luminale des CEs (Bendayan *et al.*, 2006). La P-gp possède une grande variété de substrats (de structure chimique, MM et mécanisme d'action différents), généralement des molécules à caractère amphiphile ou hydrophobe (xénobiotiques) (Balayssac *et al.*, 2005). Les MRPs possèdent également une grande variété de substrats, anions organiques, composés lipophiles conjugués au glutathion, glucuronidés ou sulfatés. L'expression de certaines MRPs reste encore à élucider surtout suite à des contradictions quant à leur localisation au niveau de la BHE (Uchida *et al.*, 2011). La BCRP est quant à elle souvent associée à la P-gp car leur distribution dans l'organisme et leurs gammes de substrats sont proches.

D'autres mécanismes sont mis en jeu pour l'efflux de certaines molécules. Certains membres de la famille des transporteurs de solutés (*solute linked carriers*, SLCs) (les *organic anion transporters* (OATs) et les *organic anion transporting polypeptides* (OATPs)) permettraient l'efflux de nombreuses molécules, dont les médicaments (Kusuhara and Sugiyama, 2005). Ces transporteurs agissent cependant comme des échangeurs sans nécessiter d'ATP. Leur localisation au sein de la CE n'est pas clairement identifiée. Leurs substrats, également variés, comprennent, entre autres, des composés anioniques et organiques, des thiopurines, des hormones thyroïdiennes, des conjugués de stéroïdes, des acides biliaires et des xénobiotiques (Hagenbuch and Meier, 2003). On retrouve également certains transporteurs d'acide aminé (dépendants du sodium), le transporteur RLIP76 ou *Ra1 binding protein* (Awasthi *et al.*, 2005), le transporteur *major vault protein/ lung resistance related protein* (MVP/LRP) ou encore celui de l'efflux des ions potassium.

Certains de ces mécanismes peuvent fonctionner de concert pour participer à « l'activité d'efflux » de la BHE.

3.2. Transport des nutriments

Le fonctionnement cérébral nécessite l'apport de nutriments, l'élimination de déchets et l'efflux vers la circulation sanguine de diverses molécules. La BHE possède ainsi un système permettant le passage dirigé de tels composés. Pour passer du compartiment sanguin au compartiment cérébral, ou *vice versa*, les composés peuvent emprunter la voie paracellulaire (passage entre les CEs) fortement restreinte par la présence des jonctions serrées, ou la voie transcellulaire. Cette dernière consiste à entrer dans la CE et à en ressortir, en franchissant successivement la membrane luminale, le cytoplasme et la membrane abluminale de la CE ou inversement.

3.2.1. Diffusion passive

La diffusion passive se définit comme le passage libre d'une molécule au travers d'une membrane selon son gradient de concentration. Cette diffusion, ne nécessitant ni transporteur ni énergie, existe au sein de la BHE mais ne concerne que quelques substances lipophiles de faible MM, non prises en charge par les pompes d'efflux, telles que l'éthanol, la nicotine et les barbiturates, et d'autres petites molécules telles que le dioxygène (O₂) et le dioxyde de carbone (CO₂) (Grieb *et al.*, 1985).

La grande majorité des composés doivent donc être pris en charge par des protéines de transport ou *via* un mécanisme de transport vésiculaire (transcytose) afin de permettre les échanges indispensables entre les compartiments sanguin et cérébral.

3.2.2. Transport facilité et transport actif

Le transport facilité et le transport actif font intervenir des transporteurs se situant sur la membrane luminale et/ou abluminale (influx et efflux). Le premier ne nécessite pas d'énergie mais permet le transport facilité de certains composés selon leur gradient de concentration. Ce mécanisme est spécifique, saturable et peut être inhibé. Le second permet le transport contre le gradient de concentration et nécessite donc de l'énergie, directement par hydrolyse d'ATP (ou autre molécule énergétique) ou selon des gradients électrochimiques (transport actif secondaire). Les hexoses dont le glucose, les acides aminés, les acides monocarboxyliques, les nucléosides (adénosine, guanosine, uridine), les purines (adénine, guanine), les acides gras, les amines (choline) ou encore les vitamines empruntent l'un ou l'autre de ces types de transport (pour revues de Boer *et al.*, 2003; Mann *et al.*, 2003).

Transport des sucres

En raison de son métabolisme élevé, le tissu cérébral serait exposé à des dommages importants s'il était privé, même brièvement, de glucose, source d'énergie majeure du cerveau. Le transporteur du D-glucose majoritairement exprimé au niveau de la BHE est le *glucose transporter-1* (GLUT-1). Il est spécifique à l'endothélium cérébral (Pardridge *et al.*, 1990). D'autres monosaccharides comme le D-mannose, le D-galactose et le D-xylose peuvent être pris en charge par ce transporteur. GLUT-1 a une localisation asymétrique au sein de la membrane plasmique puisqu'il est retrouvé avec une densité trois fois plus importante au niveau de la membrane abluminale en comparaison à sa distribution luminale (Simpson *et al.*, 2007).

Transport des acides monocarboxyliques

Le lactate et le pyruvate sont transportés *via* le *monocarboxylate transporter-1* ou MCT-1. Ce transporteur est exprimé sur la face luminale et abluminale des CEs (Leino *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 2007). Il permet également le transport des corps cétoniques, qui constituent, comme le lactate, une source d'énergie pour le cerveau dans certaines situations telles que le jeûne ou l'allaitement.

Transport des acides aminés

Le transport des acides aminés, important pour la synthèse protéique et surtout des neurotransmetteurs, est nécessaire car le SNC n'est pas autonome vis-à-vis de la production des acides aminés qu'il utilise. Il existe à ce niveau des transporteurs indépendants et dépendants des ions Na⁺ (Hawkins *et al.*, 2006).

Les premiers se divisent en quatre systèmes : le système L1 pour le transport d'acides aminés neutres, le système y⁺ pour le transport d'acides aminés cationiques, le système n pour le transport de la glutamine, de l'asparagine et de l'histidine, le système x_G⁻ pour le transport des acides aminés acides. Les systèmes L1 et y⁺ sont localisés au sein des membranes luminale et abluminale des CEs alors que les deux derniers sont localisés uniquement au sein de la membrane luminale.

Les transporteurs dépendants des ions Na⁺ sont localisés exclusivement sur la face abluminale. Ils vont permettre le transport actif de l'efflux des acides aminés (du cerveau vers le sang). On y retrouve le système A (*alanine*-preferring) pour le transport des petits acides aminés neutres non essentiels, le système ASC/B^{0,+} (*alanine, serine and cysteine*-preferring) pour le transport de petits et gros acides aminés neutres, le système LNAA (*large neutral amino acids*) pour le transport des gros acides aminés neutres, le système EAAT (*excitatory amino acid transporter*) pour le transport des acides aminés acides et le système N (*nitrogen-rich*

amino acids) pour le transport des acides aminés riches en nitrogène. Le système ASC/B^{0,+} transporte également la carnitine avec le transporteur OCTN2 (*novel organic cation transporter*) de la famille des transporteurs de solutés (SLCs) (Berezowski *et al.*, 2004b).

Transport de l'eau

La formation d'un œdème pouvant être néfaste pour le cerveau, le contrôle des mouvements d'eau est d'une importance vitale (Berezowski *et al.*, 2012). Les molécules d'H₂O sont transportées au travers de la BHE suivant les principes de l'osmolarité à l'aide de pores constitués de protéines, les aquaporines (AQPs). Les AQPs définissent une famille de protéines monomériques transmembranaires qui facilite les flux d'eau et/ou de solutés tels que le glycérol ou l'urée. L'AQP-4 est l'aquaporine la plus abondamment exprimée au niveau de la BHE et est ainsi l'aquaporine la plus étudiée (Nielsen *et al.*, 1997). Elle a été mise en évidence au niveau des pieds astrocytaires en contact avec les capillaires cérébraux et des fentes synaptiques. Sa présence au niveau des CEs n'est pas encore évidente bien que l'existence de pores aqueux soit suggérée au sein des jonctions serrées (Tsukita and Furuse, 2000). L'homéostasie de l'eau est liée à la répartition des ions, indispensables à l'activité neuronale et au fonctionnement de nombreux canaux et transporteurs.

Transport des ions

Des canaux ioniques sont présents au niveau des membranes luminale et abluminale des BCECs. L'ATPase Na⁺/K⁺, retrouvée principalement face abluminale, est responsable, avec le transporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻ et l'échangeur Na⁺/H⁺ (retrouvés au niveau luminal), de l'influx actif de sodium (Nag, 1990; O'Donnell *et al.*, 2006). L'élimination des ions K⁺ en excès, qui s'accumulent durant l'activité neuronale dans l'espace extracellulaire, et qui par l'action de l'ATPase Na⁺/K⁺ se retrouvent dans la CE, se fait alors côté luminal par des canaux potassiques (Vigne *et al.*, 1989). L'échangeur Cl⁻/HCO₃⁻, retrouvée face luminale et abluminale permet avec l'échangeur Na⁺/H⁺ la régulation du pH intracellulaire (Taylor *et al.*, 2006).

3.2.3. Transport spécialisé par vésicules

La grande majorité des macromolécules doivent emprunter, spécifiquement ou non, la voie de la transcytose. Ce mécanisme est lent (de l'ordre de la minute à l'heure) et peut se diviser en trois étapes. La première étape consiste en la liaison à la membrane du composé à transporter soit par liaison électrostatique non spécifique sur des sites anioniques (glycoprotéines), soit par liaison spécifique sur un récepteur. L'endocytose est qualifiée respectivement d'adsorptive (concerne des molécules chargées positivement telles que

l'albumine, la protamine, les histones ou certaines immunoglobulines) ou médiée par récepteur (concerne des peptides, des protéines telles que l'insuline et la transferrine liée au fer ou encore les protéines glyquées (*via* le récepteur des produits de glycation avancée (RAGE)) et des lipides *via* les lipoprotéines) (Dehouck *et al.*, 1997b; Duffy and Pardridge, 1987; Fishman *et al.*, 1987; Herve *et al.*, 2008; Meresse *et al.*, 1989; Tamai *et al.*, 1997). La deuxième étape est l'endocytose des complexes molécule-site de liaison. L'endocytose consiste en l'invagination de la membrane et en l'internalisation suivie de la migration de la vésicule formée au travers de la cellule. La dernière étape est la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique cellulaire opposée permettant l'exocytose du contenu vésiculaire dans le milieu extracellulaire.

Au moins deux types de vésicules sont impliquées dans les mécanismes d'endocytose : les puits recouverts de clathrine, qui généralement dirigent les molécules comme les lipoprotéines vers la dégradation lysosomale mais qui au niveau de la BHE permettraient la transcytose dépendante de récepteurs, et les cavéoles, considérées comme des formes spécialisées des radeaux lipidiques riches en cavéoline-1 (Abbott *et al.*, 2010; Nag, 2011).

3.3. Stratégies de vectorisation

La découverte de l'implication de ces mécanismes de transport membranaire au niveau de la BHE (Figure 4) (Abbott *et al.*, 2010; Begley, 2004; Zlokovic, 2008) offre de nouvelles perspectives thérapeutiques autres que **les approches invasives** (administration de médicaments *via* une injection intracérébrale, une injection intranasale ou grâce à une modulation de la perméabilité de la BHE (ouverture osmotique, par ultrasons ou thérapie photodynamique)) et **les approches pharmacologiques** (stratégies d'optimisation des propriétés physico-chimiques (taille, polarité, solubilité, etc.) des médicaments pour favoriser leur diffusion passive (lipidisation) ou d'administration de prodrogues (inactives, mais franchissant la BHE, converties en formes actives une fois dans le CNS)) (Gabathuler, 2010; Pardridge, 2007).

En effet, en inhibant par exemple les pompes d'efflux qui réduisent la pénétration cérébrale d'un bon nombre de médicaments, il serait possible d'en augmenter leur concentration cérébrale afin de limiter les échecs thérapeutiques (résistance multiple aux médicaments ou *multiple drug resistance*, MDR). De nombreuses études se focalisent actuellement sur l'action bloquante de substrats modifiés, d'anticorps ou d'oligonucléotides ou encore sur la régulation directe de l'expression des gènes de ces protéines d'efflux.

Inversement, l'une des stratégies les plus prometteuses consiste à cibler certaines protéines de transport (telles que le système LNAA) ou encore le transport vésiculaire (*via* par exemple les récepteurs de la transferrine, de l'insuline ou des lipoprotéines de basse densité

(LDLs) pour faciliter le passage de composés (**approche physiologique**) (Pardridge, 2006). Pour ce faire, de nombreuses méthodes sont actuellement à l'étude comme : (i) l'optimisation structurale des médicaments pour qu'ils soient reconnus par un transporteur ou un récepteur ; (ii) la création de chimères peptidiques conduisant à la liaison d'une molécule active à un anticorps spécifique d'un récepteur ou à un vecteur connu pour franchir facilement la BHE (*via* des protéines de transport ou *via* un transport vésiculaire) ; (iii) la création de liposomes ou de nanoparticules qui incorporent le médicament et qui seront internalisés par adsorption ou par liaison à certains récepteurs. La liaison à la membrane de ces derniers peut se faire grâce à la composition chimique de la particule (par exemple la cationisation) ou grâce à des ligands spécifiques ou des anticorps dirigés contre un récepteur (immunoliposomes).

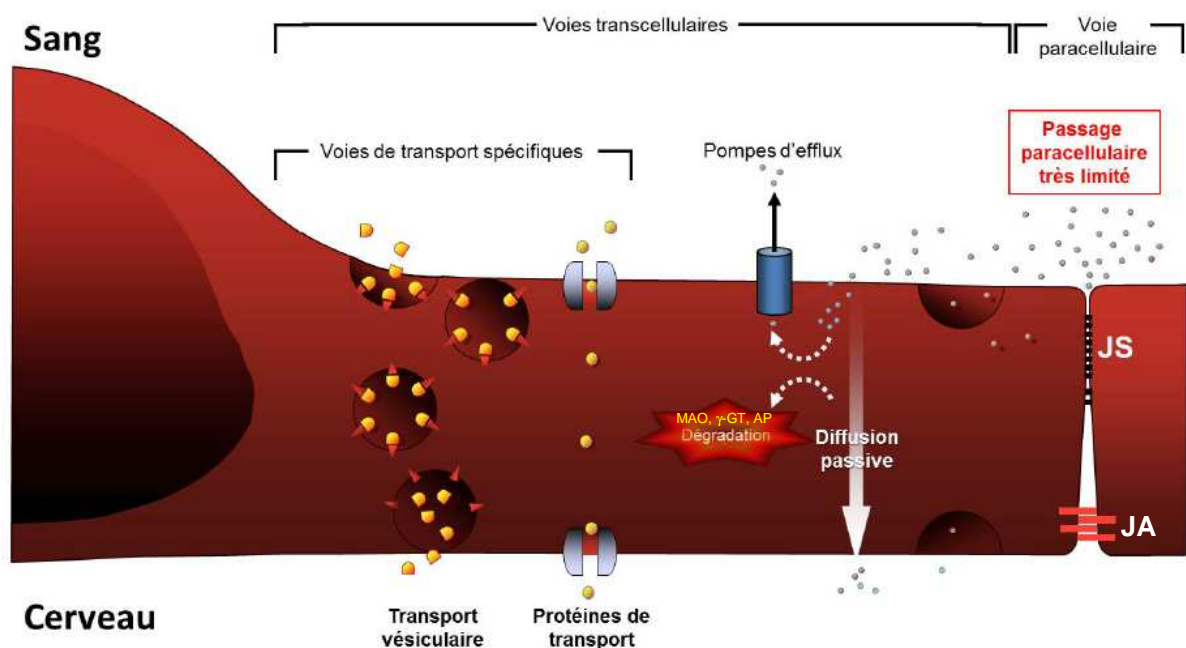


Figure 4 : Les différentes voies de transport au travers de la BHE.

Le passage des composés au travers de la BHE peut se faire par la voie paracellulaire ou transcellulaire. Les jonctions serrées limitent fortement le passage de molécules par voie paracellulaire alors que la présence de pompes d'efflux et d'enzymes de détoxification limite le passage transcellulaire non spécifique. Afin d'atteindre le parenchyme cérébral, la majorité des molécules amenées par la circulation sanguine doit alors emprunter la voie transcellulaire : la diffusion passive, la diffusion facilitée ou le transport actif (protéines de transport : pompes, canaux et transporteurs) ou encore le transport vésiculaire (transcytose). γ -GT, γ -glutamyl transpeptidase ; AP, phosphatase alcaline ; MAO, monoamine oxydase ; JS, jonction serrée ; JA, jonction adhérente. Illustration adaptée de l'iconographie du laboratoire.

Le nombre et la complexité de la fonction des transporteurs de la BHE poussent à vouloir cartographier entièrement les récepteurs et transporteurs de cette structure afin d'élucider les mécanismes du passage des composés au travers elle. Cependant, en raison du polymorphisme génétique leur étude reste difficile (fonction différente, substrats différents, etc.).

En effet, de nombreux travaux, basés sur des modèles d'étude différents (par l'espèce et le type cellulaire utilisés) présentent des résultats controversés. Par exemple, très récemment une équipe a rapporté l'expression de 114 protéines membranaires de microvaisseaux cérébraux humains en comparaison à un modèle murin. Ces auteurs mettent en exergue, grâce à la vingtaine de protéines quantifiées, la nette différence entre ces deux espèces (Uchida *et al.*, 2011). Même sur la base d'un système de transport commun chez le bovin des contradictions émergent : le transport de la transferrine impliquerait la voie des cavéoles (Descamps *et al.*, 1996) et la voie des puits recouverts de clathrine (Visser *et al.*, 2004).

4. Enzymes de la barrière métabolique

Les BCECs, à l'image des hépatocytes, possèdent une série d'enzymes caractéristiques de leur phénotype et contribuant à la dégradation et/ou l'élimination de certaines molécules. Associées aux pompes d'efflux, elles renforcent les phénomènes de restriction du passage aspécifique de certains composés (notamment les neuromédiateurs).

4.1. Enzymes de la membrane plasmique

La γ -GT est l'enzyme la plus caractéristique de la BHE (Meyer *et al.*, 1990). Cette glycoprotéine associée à la membrane (principalement luminale), catalyse le transfert de résidus γ -glutamyl d'un peptide donneur (essentiellement le glutathion) à un peptide accepteur. Elle est associée au transport de certains acides aminés et peptides au travers de la BHE et participe à la neuroprotection cérébrale contribuant au maintien d'une faible perméabilité de la BHE (Black *et al.*, 1994). Son activité est retrouvée augmentée au sein des CE de microvaisseaux cérébraux en comparaison aux autres endothéliums bien que les péricytes restent la source majoritaire de cette enzyme au niveau cérébral (Risau *et al.*, 1992). Cette activité est perturbée dans certains cas pathologiques (Yu *et al.*, 2007).

La phosphatase alcaline (AP), est une phosphomonoestérase au pH optimum élevé dont l'activité est retrouvée augmentée au niveau des BCECs et des péricytes (Meyer *et al.*, 1990). Elle permet l'hydrolyse des métabolites phosphorylés et contrôle le transport d'esters de phosphate et d'ions phosphate. Plusieurs isoformes de l'enzyme existent. L'isoforme retrouvée au niveau cérébral est dite tissu-non spécifique (*liver/bone/kidney-type*, TNAP) (Brun-Heath *et al.*, 2011; Langer *et al.*, 2008). Contrairement à son implication au niveau de la minéralisation osseuse, ses fonctions au niveau des autres tissus sont encore peu connues bien qu'une perturbation de son expression (hypo- et hyperphosphatasie) est retrouvée liée à certains troubles neurologiques (Thompson *et al.*, 2010; Whyte, 1994). La présence d'autres ecto-enzymes (peptidases et nucléotidases) est également retrouvée permettant la régulation, respectivement, des taux de peptides et de nucléotides (dont l'ATP).

4.2. Enzymes cytoplasmiques

4.2.1. Enzymes mitochondriales

Les BCECs sont extrêmement riches en mitochondries. Elles représentent jusqu'à 11 % du volume intérieur du cytoplasme des CEs contre 2 à 5 % dans les CEs périphériques (Oldendorf *et al.*, 1977). Un bon nombre de ces mitochondries est retrouvée à proximité du noyau. Cette richesse en mitochondries assure à la cellule la production d'une grande quantité d'énergie indispensable au maintien de ses caractéristiques structurales et de son activité métabolique intense.

On retrouve au niveau mitochondrial des enzymes particulières dont l'activité est augmentée au niveau de la BHE comme les monoamines oxydases-A et -B (Lai *et al.*, 1975). Elles catalysent la déamination oxydative de nombreuses amines. Ces enzymes sont connues pour dégrader certains médicaments et les neurotransmetteurs monoaminergiques (dopamine, sérotonine, noradrénaline, adrénaline) libérés par les neurones. Elles limitent ainsi les échanges transcellulaires de ces neurotransmetteurs et de leurs précurseurs du sang vers le cerveau. Certains médicaments ont une action inhibitrice sur ces enzymes et sont ainsi utilisés dans le traitement de certaines maladies comme la dépression ou la maladie de Parkinson (inhibition de la dégradation de la dopamine) (Chen and Ly, 2006).

4.2.2. Enzymes du réticulum endoplasmique (RE)

D'autres enzymes de la barrière métabolique participent à la fonction de détoxification de la BHE : les monooxygénases à cytochrome P450 qui permettent l'oxydation de composés (Decleves *et al.*, 2011), les glycosyltransférases (telles que l'uridine 5'-diphospho (UDP)-glucuronosyltransférase qui permet l'ajout d'un acide glucuronique (De Gregori *et al.*, 2012)) ou encore les glutathion peroxydases (enzymes antioxydantes retrouvées cependant au niveau du cytosol, de la mitochondrie et même des membranes). Ces enzymes sont principalement exprimées au niveau des plexus choroïdes (Gherzi-Egea *et al.*, 1995).

5. Protéines et mécanismes cytoplasmiques

Le cytoplasme englobe la totalité du matériel cellulaire contenu par la membrane plasmique d'une cellule vivante. Il se compose de différents organites baignant dans un milieu aqueux, source de nombreuses réactions chimiques, le cytosol. Son organisation reflète l'état de la cellule et ses fonctions. Les composants du cytoplasme sont en étroite corrélation les uns avec les autres et avec la membrane plasmique. La Figure 5 montre la complexité de ces interactions. Le phénotype BHE des CEs va ainsi refléter une organisation très spécifique impliquant de nombreux mécanismes particuliers.

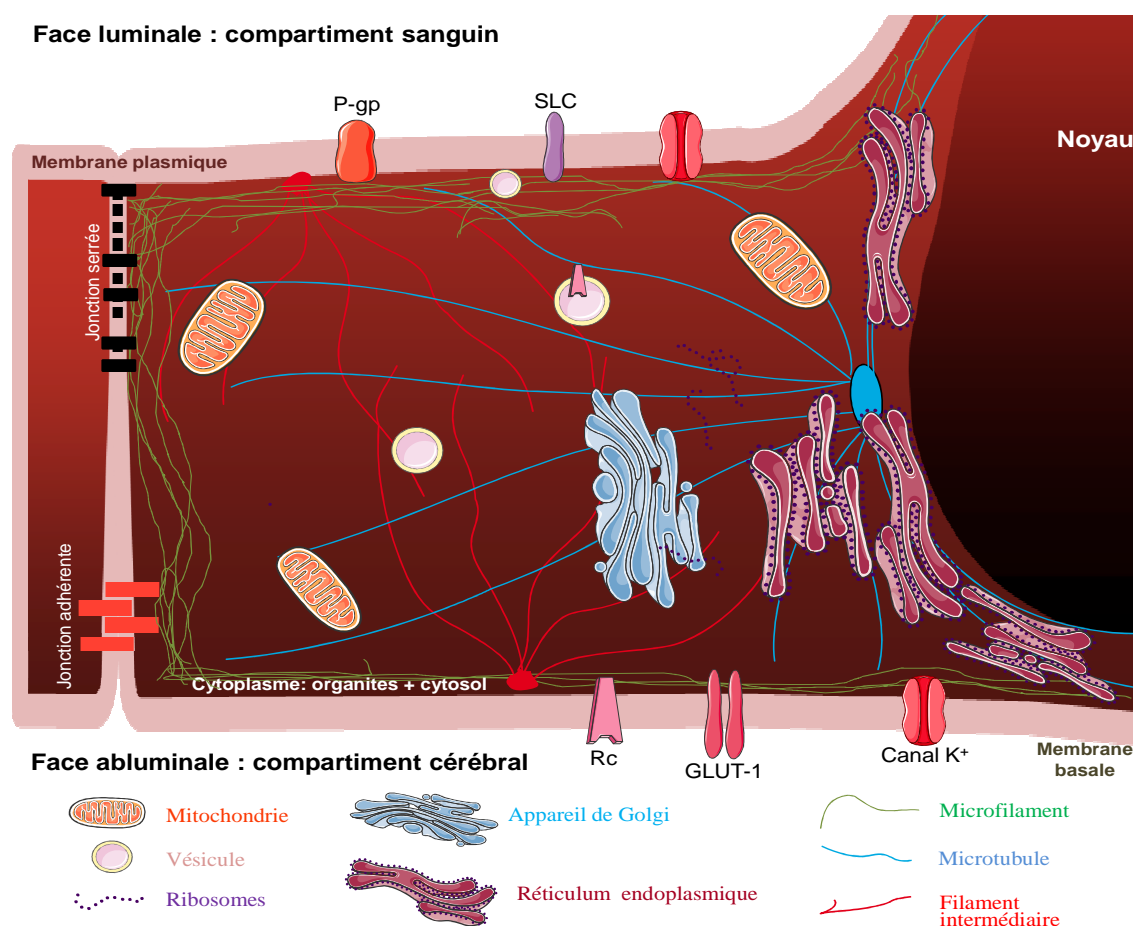


Figure 5 : Schéma montrant l'importance du cytosquelette dans l'organisation cellulaire.

Les composants cellulaires (membranaires et cytoplasmiques) sont en étroite corrélation les uns avec les autres reflétant une organisation très spécifique et régulée de la CE. Certains récepteurs (Rc) et transporteurs sont cités à titre d'exemples (GLUT-1, *glucose transporter-1* ; P-gp, P-glycoprotéine ; SLC, *solute linked carriers*). Illustration réalisée grâce à *Servier Medical Art* et adaptée de l'iconographie du laboratoire.

5.1. Cytosquelette

Le cytosquelette, formé par les microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules, assure la forme et l'architecture de la cellule. Il peut être considéré comme un « squelette » non rigide mais dynamique. Il va permettre le contrôle des différents mouvements à l'intérieur de la cellule (orientation des vésicules ou directement des molécules) grâce au soutien des différents organites. L'interaction entre les cavéoles et les protéines formant le cytosquelette ainsi que certaines protéines associées au cytosquelette montre son importance dans l'orientation des vésicules (Lisanti *et al.*, 1994; Richter *et al.*, 2008).

Le cytosquelette est relié aux jonctions serrées et aux intégrines *via* une plaque cytoplasmique (constituée de protéines adaptatrices) permettant respectivement une régulation des adhésions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire. Ces interactions régulent en partie la perméabilité endothéliale, la transmission de signaux des jonctions ou des intégrines

vers l'intérieur de la cellule dans le but de moduler certains procédés cellulaires (migration ou expression génique).

La perturbation du cytosquelette à l'aide de la cytochalasine D, de cytokines, ou d'analogues de la bradykinine se répercute au niveau des jonctions serrées. La perturbation de l'agencement des jonctions serrées induit alors une augmentation ou une réduction de la perméabilité microvasculaire (Bentzel *et al.*, 1976; Liu *et al.*, 2008; Stevenson and Begg, 1994).

L'actine filamenteuse (actine F), polymérisée à partir d'actine globulaire (actine G), donne au cytosquelette une structure nécessaire au maintien de la morphologie cellulaire. Rubin *et al.* (Rubin *et al.*, 1991) montrent que l'actine F est diffuse et répartie au sein du cytoplasme lors d'une diminution de la résistance des jonctions serrées, alors qu'elle est localisée principalement au niveau de la membrane plasmique lors d'une augmentation de cette résistance. L'importance de certains acteurs du remodelage du cytosquelette, tels que l'actine, la gelsoline et la filamine-A, pour l'acquisition du phénotype de BHE a été illustrée récemment (Pottiez *et al.*, 2009). Bien qu'aucune preuve directe n'ait encore été rapportée, l'hypothèse avancée suite à l'étude de la littérature, est que la gelsoline, agent de dépolymérisation de l'actine F, serait inhibée par l'augmentation de la concentration cellulaire du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate au niveau des CEs co-cultivées avec des cellules gliales (comprenant les astrocytes) en comparaison aux CEs solo-cultivées. Cette inhibition provoquerait la polymérisation de l'actine F ainsi que son recrutement à la membrane plasmique *via* des protéines d'ancrages telle la filamine-A. L'actine F périmembranaire serait donc un acteur de l'établissement du phénotype de BHE et participerait à l'ancrage des protéines membranaires et périmembranaires (jonctions serrées, protéines de transport, récepteurs, etc.) (Figure 6).

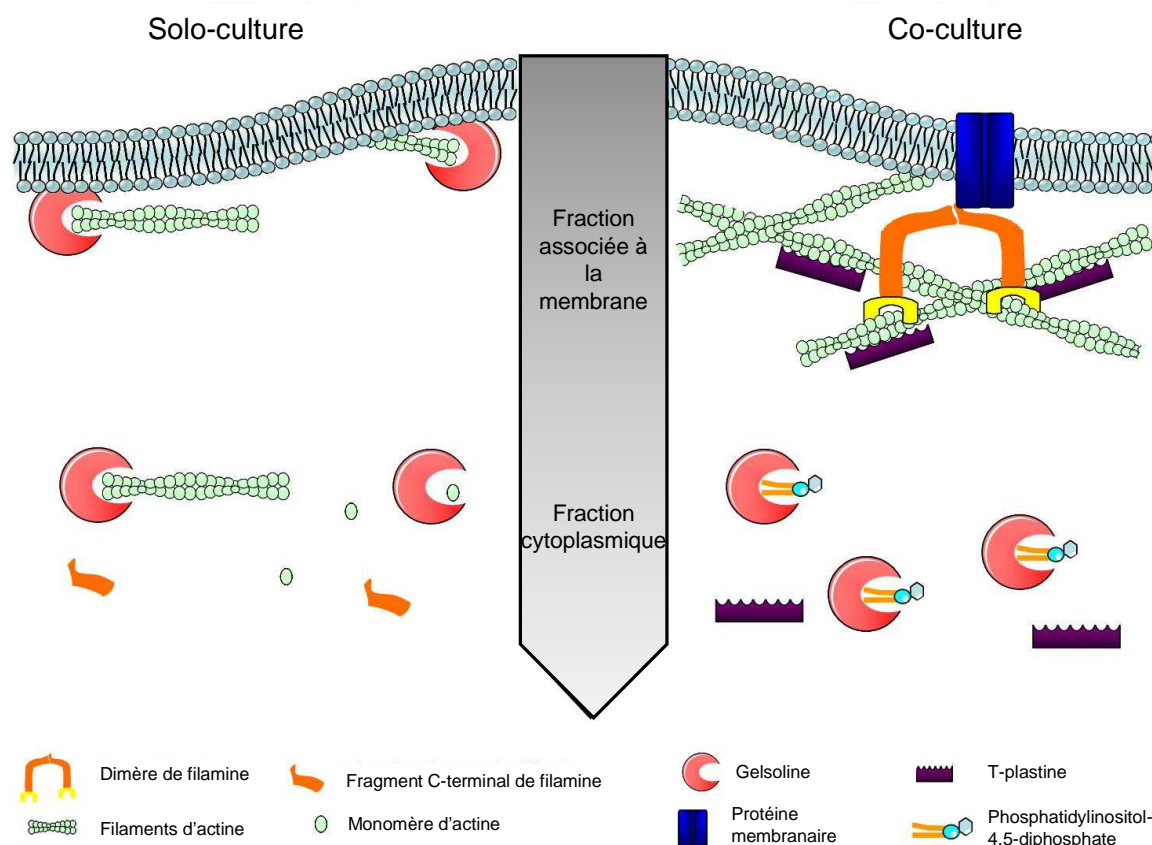


Figure 6 : Représentation schématique illustrant l'hypothèse de l'importance de certains acteurs du remodelage du cytosquelette pour l'acquisition du phénotype de BHE.

En solo-culture, la gelsoline, protéine de dépolymérisation de l'actine, pourrait jouer un rôle dans la réduction de l'étanchéité de la BHE en limitant l'interaction des filaments d'actine avec les jonctions serrées au sein de la CE. En co-culture avec des cellules gliales, la gelsoline serait inhibée par le PIP₂ permettant la réduction de la quantité de filaments d'actine (actine F) dans la fraction cytoplasmique en faveur de l'actine F pérимembranaire (dans la fraction associée à la membrane). Parallèlement, la réorganisation périphérique de l'actine F serait orchestrée par des protéines de liaison et de compactage de l'actine F telles que la filamine-A et la T-plastine. Illustration adaptée de Pottiez *et al.*, 2009.

5.2. Organites

Le réticulum endoplasmique (RE), lieu de stockage du calcium intracellulaire, permet la production d'un grand nombre de lipides (RE lisse) et de protéines (RE granuleux) dont les protéines transmembranaires, les protéines résidentes des autres organites (RE, Golgi, endosomes, lysosomes) et les protéines sécrétées, mais est également le site de certaines modifications post-traductionnelles (MPTs). Le RE est responsable de la communication interne des différentes régions de la cellule grâce à sa continuité avec à la fois la membrane plasmique et la membrane nucléaire.

L'appareil de Golgi forme la continuité du RE. Il participe au processus de sécrétion grâce au stockage et au traitement des molécules à sécréter provenant du RE. Les molécules

seront sécrétées à l'extérieur de la cellule *via* des vésicules de sécrétion. Certaines vésicules Golgiennes sont cependant destinées à devenir des lysosomes, vésicules contenant des enzymes digestives pour la dégradation des composés. La toxine pertussique agit sur l'intégrité de la monocouche de CEs de BHE (Kügler *et al.*, 2007). Il en résulte une augmentation de la perméabilité paracellulaire, une diminution de la TEER mais aussi une déstructuration transitoire de l'organisation cellulaire avec une désagrégation des complexes Golgiens.

Le transport vésiculaire des composés fait intervenir des organites spécifiques de la cellule dont l'appareil de Golgi, les endosomes, les vésicules d'endocytose et les lysosomes (Broadwell *et al.*, 1988; Villegas and Broadwell, 1993). La P-gp est retrouvée distribuée à la fois au niveau de la membrane plasmique mais également le long de l'enveloppe nucléaire, des cavéoles, des vésicules cytoplasmiques, de l'appareil de Golgi et du RE (Bendayan *et al.*, 2006). Elle est ainsi exprimée aux sites de synthèse protéique et du trafic vésiculaire.

5.3. Transduction du signal

Les phénomènes de transduction du signal sont nombreux au sein d'une cellule. Les CEs sont tout particulièrement sensibles aux divers signaux extérieurs (au niveau sanguin, au niveau cérébral et surtout par les interactions avec les constituants de l'UNGV). L'activation de voies de signalisation spécifiques (pour revue, Mehta and Malik, 2006) régule le transport para et transcellulaire des composés au travers des CEs. En voici quelques exemples :

Une augmentation, notamment dans un contexte pathologique, ou à l'inverse une diminution de la perméabilité paracellulaire de la monocouche de CEs s'expliquent par, respectivement, une désorganisation ou une organisation du complexe jonctionnel (Wolburg and Lippoldt, 2002). Cette désorganisation est contrôlée à trois niveaux : un changement de l'organisation du cytosquelette, des MPTs portées par les protéines ou encore leur dégradation. L'implication des phénomènes de phosphorylation ou de déphosphorylation dans la régulation des jonctions serrées n'est plus à prouver. Ce phénomène a même été observé pour les cavéoles (Parton *et al.*, 1994). La signalisation Rho est impliquée dans la régulation des jonctions serrées à la fois *via* la phosphorylation des protéines mais aussi par régulation de l'expression des gènes (Terry *et al.*, 2010). L'occludine est quant à elle la plaque tournante de plusieurs voies de signalisation telles que la voie dépendante des MAP-kinases ou encore *via* la signalisation Rho, Raf1 et TGF β (Barrios-Rodiles *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Les jonctions adhérentes sont également impliquées dans de nombreuses voies de signalisation (Dejana and Giampietro, 2012). La β -caténine contrôlerait la voie Wnt pour l'activation de facteur de transcription dans un contexte développemental (Liebner *et al.*, 2008). Les interactions cellules-matrice extracellulaire sont très importantes pour ces régulations. Les intégrines, permettant la liaison à la membrane basale, sont capables de réguler la perméabilité endothéliale grâce à leur liaison directe avec le cytosquelette *via* des molécules de liaison telles que la paxilline, la

vinculine, la taline ou l' α -actinine. Ces interactions sont également importantes pour la régulation des signaux de prolifération, de différenciation et de migration.

Plusieurs études ont montré l'implication de seconds messagers, tels que le calcium (Stuart *et al.*, 1994), l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) mais aussi la phospholipase C, les protéines kinases A et C ainsi que des protéines G dans la régulation des jonctions serrées suggérant l'implication de nombreuses voies de signalisation (Haskins *et al.*, 1998; Kniesel and Wolburg, 2000). La mise en culture de CEs en présence de milieu conditionné d'astrocytes et d'agents responsables d'une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire permet le renforcement de certaines caractéristiques du phénotype BHE (voir chapitre II), dont une augmentation de la TEER (Rubin *et al.*, 1991). Ces auteurs montrent, suite à l'élévation du taux d'AMPc, une réorganisation du cytosquelette et des jonctions serrées (décrit en section 2 de ce chapitre) qui serait dépendante de l'activation de la protéine kinase A.

Les transporteurs et récepteurs sont également régulés de la même façon. L'aquaporine, par exemple, serait modulée par la protéine kinase C (Yamamoto *et al.*, 2001). De même, les cavéoles sont liées à de nombreuses voies de signalisation (Thomas and Smart, 2008) grâce notamment à la cavéoline-1 qui permet le recrutement de molécules de signalisation (Frank *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1996).

L'étude de la BHE en condition pathologique révèle également l'activation de certaines voies. Ainsi, des conditions inflammatoires (facteur de nécrose tumorale, TNF- α) activent la voie MAP Kinase et amplifient la transcytose (Descamps *et al.*, 1997).

L'étude des voies de transduction, dans un contexte physiologique et/ou pathologique, s'avère complexe. De nombreuses généralisations (dont certaines citées ci-dessus) sont basées sur la comparaison des CEs aux cellules épithéliales mais la filiation entre ces deux types cellulaires reste tout de même éloignée. Ces mécanismes sont souvent différents selon le type cellulaire étudié et impliquent plusieurs stimuli possibles (molécules secrétées par les cellules voisines, interactions, composition du sang, etc.). Plusieurs voies sont mises en jeu avec certainement un mécanisme de recoupement. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces interactions et dans la régulation du phénotype BHE restent ainsi encore mal connus.

La BHE possède des propriétés structurales et métaboliques spécifiques restreignant les échanges moléculaires aspécifiques du sang vers le cerveau et inversement, indispensables au maintien de l'homéostasie cérébrale. Elle permet en outre la protection du parenchyme cérébral et la régulation efficace des échanges entre les compartiments sanguin et cérébral mais également une diminution du passage des médicaments vers le cerveau (Abbott *et al.*, 2006; Haseloff *et al.*, 2005). Depuis la découverte de cette interface il y a 127 ans, le phénotype BHE a été bien caractérisé au niveau membranaire en ce qui concerne les protéines des jonctions serrées, responsables de la faible perméabilité paracellulaire, les récepteurs et transporteurs spécifiques régulant le passage transcellulaire mais également les protéines d'efflux moléculaires, destinées à réexpédier vers la circulation sanguine certaines molécules exogènes (Ohtsuki and Terasaki, 2007). Bien que le rôle non négligeable des protéines du cytoplasme soit largement rapporté, les données (nature, mécanisme moléculaire, etc.) concernant les acteurs cytoplasmiques impliqués dans le phénotype BHE restent encore floues. Les propriétés phénotypiques de la BHE sont régulées au niveau moléculaire par des voies de signalisation spécifiques encore obscures. Afin d'étudier plus précisément ces molécules cytoplasmiques à l'intérieur de la CE et ainsi démêler les mécanismes se déroulant au niveau de la BHE, plusieurs possibilités s'offrent à nous : des modèles *in vivo* ou *in vitro*. Le deuxième chapitre de cette étude bibliographique développera les principaux modèles de BHE dans le but de sélectionner un modèle adéquat d'étude de ces molécules.

Chapitre II

Quel modèle biologique choisir pour l'analyse protéomique des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique ?

Sommaire

1. Études adaptées au suivi de molécules d'intérêt.....	- 49 -
1.1. Études <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	- 49 -
1.2. Études <i>in silico</i>	- 51 -
1.3. Études <i>in vitro</i> non cellulaires.....	- 52 -
1.4. Utilisations majeures de ces modèles	- 53 -
2. Études adaptées à des analyses approfondies des mécanismes cellulaires et moléculaires	- 53 -
2.1. Modèles <i>in vitro</i> de microvaisseaux cérébraux isolés	- 54 -
2.2. Modèles cellulaires <i>in vitro</i>	- 54 -
3. Choix d'un modèle d'étude adéquat pour l'étude des protéines des CEs de BHE-	- 62 -
3.1. Quel type de modèle choisir ?.....	- 62 -
3.2. Modèle <i>in vitro</i> de BHE développé au laboratoire.....	- 62 -

Pendant longtemps, l'étude du système nerveux (la neuroscience) s'est focalisée principalement sur les neurones et leurs interactions avec d'autres cellules nerveuses : les cellules gliales. Il est aujourd'hui clairement établi que les cellules nerveuses sont en étroite communication avec les CEs des microvaisseaux cérébraux formant l'UNGV.

De par leurs propriétés spécifiques, les CEs de la BHE permettent le maintien de l'homéostasie cérébrale. Empêchant le passage du sang vers le cerveau d'un grand nombre de molécules thérapeutiques à visée cérébrale, cette barrière est un obstacle supplémentaire dans la lutte quotidienne contre les affections du SNC. L'étude de la BHE est ainsi devenue un enjeu thérapeutique majeur, à l'origine du développement de nombreux modèles expérimentaux.

L'étude de la BHE peut se faire *in vivo* (utilisation d'animaux), *ex vivo* (utilisation de tissus), *in vitro* (utilisation de cellules) et même *in silico* (utilisation de modèles mathématiques). Cependant, chaque modèle a souvent été développé dans l'optique d'une étude particulière. Certains modèles ont été établis dans le but de déterminer ou prédire le passage de composés au travers de la BHE alors que d'autres sont plus adaptés à la caractérisation des propriétés et des mécanismes cellulaires et moléculaires de la BHE, en conditions physiologiques ou pathologiques (Mensch *et al.*, 2009).

Chacun des modèles présentés ici possède ses avantages mais aussi ses limites ce qui fait qu'aucun d'entre eux n'est un modèle « parfait » pour l'étude, à tous les niveaux, de la BHE. Les différences existantes entre chaque modèle sont nombreuses. Parmi les plus importantes, on retrouve le problème éthique du nombre d'animaux sacrifiés, les besoins techniques pour leur mise en place et utilisation, les délais d'obtention, les coûts, la corrélation avec le vivant (en incluant chaque paramètre) et *in fine* la corrélation du modèle avec l'homme, intérêt majeur en médecine.

Plus éthiques et mieux adaptés à certaines expérimentations de recherche, de nombreux modèles *in vitro* de BHE visant à estimer son intégrité, étudier, prédire ou optimiser le passage de composés au travers elle, ont été et continuent à être mis au point. Leur diversité, leurs intérêts, leurs avantages et inconvénients sont synthétisés dans des revues (Deli *et al.*, 2005; Naik and Cucullo, 2012).

Notre objectif étant d'étudier les protéines des CEs de la BHE, il est important de choisir un modèle d'étude adéquat. Ce deuxième chapitre de l'étude bibliographique est consacré à la présentation des différentes techniques d'étude de la BHE et de leur pertinence dans le cadre d'une analyse protéomique.

1. Études adaptées au suivi de molécules d'intérêt

L'évaluation de la distribution cérébrale des médicaments est indispensable pour le développement de composés en industrie pharmaceutique. Le passage d'un composé au travers de la BHE dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques dont sa lipophilie, sa charge et sa taille (diffusion passive). Le **ratio [cerveau]/[plasma]** (*brain to plasma ratio*) de ce composé est également dépendant de certains facteurs tels que sa liaison aux protéines plasmatiques ou au tissu cérébral, sa liaison à des récepteurs ou transporteurs incluant les pompes d'efflux ou encore le flux sanguin. La BHE étant également une barrière métabolique, la pénétration cérébrale du composé dépend aussi de sa reconnaissance vis-à-vis des enzymes de détoxification (Reichel, 2009). Le ratio [cerveau]/[plasma] ne rend pas compte de la concentration de molécules libres (non liées) dans le cerveau qui est cependant le lien direct avec l'efficacité thérapeutique cérébrale d'un médicament. De nombreux modèles sont ainsi utilisés pour la prédiction du passage de ces composés au travers de la BHE et pour le calcul de ces différentes concentrations (pharmacocinétique).

1.1. Études *in vivo* et *ex vivo*

Les études *in vivo* et *ex vivo* de la BHE sont particulièrement intéressantes par la prise en considération de la complexité anatomique de la BHE (interactions cellulaires, flux sanguins, etc.). Elles sont utilisées pour l'évaluation du passage d'un composé au travers de la barrière en conditions physiologiques (animaux sains) ou pathologiques (animaux transgéniques ou modèles pathologiques). Parmi les animaux les plus utilisés, on retrouve les rongeurs de petite taille (rat, souris), avantageux pour leur coût d'achat et d'entretien et leur taille, mais également des cobayes, des lapins, des chiens ou même des singes pour les contrôles des études précliniques. Des techniques d'étude non invasives et invasives, nécessitant une intervention chirurgicale et/ou le sacrifice des animaux, ont été développées.

1.1.1. Approches *in vivo* non invasives

Les techniques d'étude non invasives sont principalement basées sur l'imagerie et sont représentées par **la tomographie par émission de positons (TEP)** et **l'imagerie par résonance magnétique (IRM)**. Elles présentent l'avantage d'être applicables à l'homme mais sont cependant onéreuses.

La TEP, transposable chez l'homme ou l'animal, consiste en l'injection intraveineuse d'un traceur radioactif émettant des positons (ou d'un composé couplé à un isotope émettant des positons) puis à sa détection, *via* un TEP-Scan à haute sensibilité, grâce aux photons émis lors de la destruction des positons. Ces derniers sont émis par retour à un état d'équilibre des

atomes instables du composé radioactif. Ainsi, il est possible de visualiser et de suivre la distribution du traceur dans l'organisme en temps réel à l'aide d'images en deux dimensions reconstituées informatiquement. Au niveau cérébral, plusieurs études sont envisageables : l'imagerie de perfusion cérébrale (CO_2 ou H_2O marqués), l'étude du métabolisme (passage du glucose ou d'acides aminés marqués), l'étude de récepteurs ou transporteurs (passage de différents ligands marqués) ou l'étude de l'intégrité de la BHE (passage du ^{68}Ga -acide éthylène diamine tétra-acétique (^{68}Ga -EDTA)). L'étude du passage de ces composés au travers de la BHE peut être réalisée en conditions physiologiques ou pathologiques afin de déterminer leur localisation ou leur constante de transfert sang-cerveau ou alors d'évaluer l'intégrité de la BHE (Mazoyer, 2002).

L'IRM, de haute résolution spatiale, s'appuie quant à elle sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons d'hydrogènes des molécules d' H_2O . Les tissus lésés (lésions de la BHE) et les tumeurs sont détectés *via* cette technique grâce à l'utilisation d'agent de contraste (Kassner and Thornhill, 2011). Le taux de transfert d'un agent de contraste du sang vers le cerveau peut ainsi être déterminé.

1.1.2. Approches *in vivo* invasives

Il existe plusieurs techniques *in vivo* dites invasives. La plus simple, la **perfusion intraveineuse**, consiste à injecter un composé de concentration connue chez un animal puis à évaluer le passage cérébral du composé en comparant sa concentration cérébrale et systémique. Des échantillons sanguins sont collectés pour déterminer la concentration systémique, et la concentration cérébrale du composé est évaluée après décapitation de l'animal (Mayer *et al.*, 1959).

Pour s'affranchir de la métabolisation possible du composé par les organes périphériques, le composé peut être injecté directement au niveau de l'artère carotide (Oldendorf, 1970). **L'indice d'absorption cérébrale** (*brain uptake index*, BUI) est déterminé en suivant la concentration du composé à tester dans le compartiment cérébral et plasmatique en comparaison à une molécule de référence, connue pour franchir facilement la BHE. **L'indice d'efflux cérébral** (*brain efflux index*, BEI) peut aussi être déterminé de la même façon en injectant le composé cette fois-ci au niveau cérébral.

La perfusion cérébrale *in situ* consiste à injecter le composé directement au niveau de l'artère carotide interne. En effet, l'injection au niveau de l'artère carotide engendre une perte du composé assez élevée puisque 20 % entrent dans l'artère carotide interne et 80 % dans l'artère carotide externe. Seuls les 20 % atteindront alors la circulation sanguine cérébrale. Ainsi, en perfusant directement l'artère carotide interne, la totalité du perfusé (dont la composition peut être variée) atteindra cette circulation (Takasato *et al.*, 1984).

La microdialyse intracérébrale nécessite quant à elle l'implantation d'une sonde dans le parenchyme cérébral. La sonde est composée d'une membrane semi-perméable perfusée avec une solution physiologique (le perfusat). Le composé à suivre est quant à lui administré par voie orale, intraveineuse ou subcutanée. La concentration libre du composé dans le parenchyme cérébral peut ainsi être évaluée grâce à sa diffusion au travers de la membrane (Aasmundstad *et al.*, 1995; Westergren *et al.*, 1995). Ces deux dernières techniques, et notamment la microdialyse, bien que plus précises, nécessitent une intervention chirurgicale lourde et fastidieuse pouvant affecter la BHE.

D'autres techniques invasives basées sur l'obtention de coupes cérébrales sont envisageables. **L'autoradiographie quantitative** consiste à suivre un composé radioactif injecté (Solon, 2012). La collecte d'échantillons sanguins et la réalisation de coupes cérébrales qui sont autoradiographiées permettent de visualiser la distribution et de quantifier le composé radioactif. L'utilisation de la **microscopie** (photonique et électronique) sur des préparations de tissus ou même de cellules (*in vitro*), permet l'étude morphologique de la BHE, l'étude des mécanismes de transport mais également l'étude de la localisation subcellulaire de transporteurs, récepteurs, ou encore d'autres protéines ou molécules diverses. Plus récemment, l'**imagerie MALDI** (ionisation/désorption laser assistée par matrice), basée sur l'utilisation d'un spectromètre de masse possédant une source MALDI (voir chapitre III), pour l'analyse quantitative des coupes tissulaires, émerge comme une technique prometteuse (Takai *et al.*, 2012). Cette approche permet une localisation tissulaire d'un bon nombre de composés (protéines, peptides, lipides, etc.) détectables par l'appareil sans utilisation de radioéléments. Contrairement à la technique d'autoradiographie quantitative, l'imagerie MALDI est capable de distinguer le composé analysé de ses métabolites.

1.2. Études *in silico*

Grâce aux progrès de l'informatique et surtout des algorithmes d'apprentissage et de prédiction, les modèles *in silico*, basés sur l'utilisation d'outils informatiques, présentent un intérêt croissant pour la conception de médicaments. Ces outils essaient de prédire la perméabilité endothéliale cérébrale pour différentes molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques ou structurales (**relation structure-activité**, SAR). Sur la base de résultats expérimentaux (base de données) ces propriétés (MM, charge, lipophilie, solubilité, structure, etc.) sont prises en considération, au travers d'algorithmes prédictifs complexes, et corrélées avec une (des) donnée(s) biologique(s) et/ou la réactivité chimique. Il est alors possible de prédire la pénétration cérébrale d'un composé à condition d'en connaître les propriétés physico-chimiques.

Il a été montré une bonne corrélation entre la lipophilie (logarithme du coefficient de partage octanol/eau) et la perméabilité endothéliale cérébrale (logarithme de la perméabilité obtenue *in vivo* par perfusion cérébrale *in situ*) de molécules dont le passage au travers de la BHE se fait principalement par diffusion passive. Ces modèles *in silico* ne prennent pas en compte la possibilité de fixation de ces composés aux protéines plasmatiques, de métabolisation, de prise en charge par des transporteurs ou encore de toxicité (Mehdipour and Hamidi, 2009). En effet, la corrélation lipophilie/perméabilité est beaucoup moins flagrante pour des molécules prises en charge par des transporteurs d'influx ou d'efflux (Smith, 2003). De nouveaux modèles permettant l'intégration de facteurs particuliers tels que la probabilité de substrat pour la P-gp (HAPSP, pour *high affinity P-glycoprotein substrate probability*) ou encore le ratio de liaison aux protéines plasmatiques (PPBR pour *plasma protein binding ratio*) émergent pour la prédiction du passage de composés au travers de la BHE par transport passif mais aussi actif (Wu *et al.*, 2012).

1.3. Études *in vitro* non cellulaires

A l'image des études *in vitro*, il est possible de modéliser la couche lipidique externe des membranes cellulaires à l'aide de **membranes artificielles immobilisées** (IAMs). Ces membranes artificielles consistent en une monocouche de phospholipides reliée par covalence à des particules inertes de silice. Utilisées le plus souvent comme chromatographie pour la purification de substances, elles permettent également d'étudier les interactions médicament/membrane et de prédire la perméabilité de composés au travers des membranes biologiques (Reichel and Begley, 1998). Les limitations de l'utilisation de ces IAMs, pour la prédiction de la perméabilité, résident dans leur couche unique de phospholipides et dans leur capacité limitée à reproduire les propriétés dynamiques des membranes biologiques.

Les **parallel artificial membrane permeability assays** (PAMPAs) sont également utilisées pour prédire la perméabilité de certaines molécules (Kansy *et al.*, 1998). Ce système utilise une membrane lipidique artificielle sur un support solide filtré permettant d'obtenir un compartiment donneur et un compartiment accepteur. Il est ainsi aisé de quantifier le passage de composés entre le compartiment donneur et accepteur de façon automatique et reproductible. Ce système a été modifié pour former une BBB-PAMPA dont la membrane est réalisée à l'aide d'un extrait lipidique de cerveau de porc (Di *et al.*, 2003).

Les limites des méthodes *in silico* se retrouvent donc également ici. L'utilisation de ces membranes ne permet que de prédire, sur des systèmes imparfaits, le passage de composés transportés de façon passive au travers des membranes biologiques.

1.4. Utilisations majeures de ces modèles

Ces différents modèles sont particulièrement utilisés en industrie pharmaceutique où le criblage de nombreuses molécules est une stratégie courante. Ils permettent d'étudier le passage de composés au travers de la BHE et/ou l'intégrité de celle-ci. Une première approche *in silico*, ou encore *in vitro via* les modèles non cellulaires, permet dans un premier temps d'estimer rapidement, à haut débit et à faible coût, le potentiel de pénétration cérébrale de nombreux composés mais uniquement de façon passive, sans tenir compte des éventuels transporteurs pouvant les prendre en charge, des éventuelles enzymes susceptibles de les dégrader, et de la concentration libre ou liée aux protéines du plasma ou au tissu cérébral.

Trop coûteux, trop long et non éthique, le criblage à haut débit n'est pas envisageable *in vivo*. Cependant, l'utilisation de ces méthodes *in vivo* reste indispensable pour la validation pré-clinique des résultats obtenus *in silico* ou *in vitro* avec les molécules les plus prometteuses.

Il est techniquement tout à fait possible d'étudier les protéines issues d'un système *in vivo*, après injection d'un composé ou non, par exemple pour confirmer l'action de ce composé au niveau protéique. Pour cela, une extraction des tissus puis des protéines est nécessaire. Cependant, l'étude des protéines d'un seul type cellulaire est peu aisée en raison d'une accessibilité difficile et d'une contamination des cellules-cibles par les cellules voisines. L'anatomie de la BHE en est l'exemple type. En effet, l'extraction de CEs de la BHE implique l'extraction des pieds astrocytaires et même des péricytes enchâssés dans la membrane basale des CEs. Ces études *in vivo* sur les protéines sont envisageables pour compléter des recherches déjà bien avancées sur le plan protéomique. Lors de la mise en route d'une approche protéomique, il est donc souvent plus judicieux (voire nécessaire) d'utiliser des modèles plus adaptés à l'étude des protéines d'un type cellulaire donné, en d'autres termes des modèles stables qui permettent d'obtenir de grandes quantités de cellules identiques, manipulables aisément et présentant le meilleur rendement possible.

2. Études adaptées à des analyses approfondies des mécanismes cellulaires et moléculaires

La nécessité de disposer de modèles plus « maniables » a conduit au développement des modèles cellulaires *in vitro*. Les modèles *in vitro* ont l'avantage, une fois les cellules extraites de l'organisme et isolées des tissus environnants, de les cultiver et de les amplifier en « boîte/flasque » et donc de ne plus travailler sur les animaux. En plus de la réduction considérable du nombre d'animaux à utiliser, l'avantage majeur de ces modèles vis-à-vis des modèles *in vivo* réside dans la simplification de l'environnement de travail et la réduction des coûts de recherche. Cependant, cette simplification a un « coût » biologique, dont principalement la perte de certaines propriétés liées au phénotype BHE.

2.1. Modèles *in vitro* de microvaisseaux cérébraux isolés

Les microvaisseaux cérébraux de nombreuses espèces sont extraits selon différentes techniques (Joó, 1985; Pardridge, 1998). Globalement, après récupération du cortex cérébral d'un organisme, le tissu cérébral est homogénéisé mécaniquement et/ou par digestion enzymatique (Panula *et al.*, 1978). Les microvaisseaux sont ensuite isolés à l'aide d'étapes de filtration ou de centrifugation (Joó and Karnushina, 1973). Ces microvaisseaux comprennent ainsi des artérioles, des capillaires et des veinules.

Isolés, les microvaisseaux cérébraux présentent des caractéristiques très proches de leurs caractéristiques *in vivo* de par leur intégrité structurale, leur métabolisme et leur profil d'expression génique de certains transporteurs et récepteurs clefs (Bickel, 2005; Brendel *et al.*, 1974; Shivers *et al.*, 1984).

Cependant, les principaux désavantages de ces modèles résident dans la contamination possible avec d'autres types cellulaires et dans une déficience métabolique induite par l'isolement (découplage des chaînes respiratoires mitochondriales) (Lasbennes and Gayet, 1984) pouvant induire une baisse d'activité de certains transporteurs. La face luminale étant difficilement accessible, en raison de la nature même du matériel isolé, les criblages de perméabilité ne sont pas adaptés. Ils permettent cependant l'étude des propriétés morphologiques et structurales de la BHE, l'étude mécanistique (Catalán *et al.*, 1996) et l'étude de protéines telles que les récepteurs et les transporteurs.

2.2. Modèles cellulaires *in vitro*

Les modèles de microvaisseaux cérébraux isolés ont conduit à l'extraction de CEs microvasculaires et à la création de modèles cellulaires. Ces modèles cellulaires se basent sur l'attachement des cellules à une matrice suivi de leur croissance et de leur développement dans des milieux de culture spécifiques. De nos jours, de nombreux modèles *in vitro* de BHE ont été décrits (Deli *et al.*, 2005; Gumbleton and Audus, 2001) se distinguant par le type et l'origine animale des CEs utilisées, leur protocole d'isolement, leur modification génétique, leur condition de culture, etc. Cette multiplicité des modèles résulte de besoins spécifiques en réponse, encore une fois, à des problématiques données (Cecchelli *et al.*, 2007). Contrairement aux modèles de microvaisseaux, les compartiments luminal et abluminal sont accessibles dès lors que la culture cellulaire s'effectue sur filtre (surface poreuse). Contrairement à la situation *in vivo*, où les CEs sont exposées aux protéines sériques uniquement côté luminal, dans ces conditions *in vitro*, les CEs sont cultivées dans un milieu de culture (additionné généralement de protéines sériques) placé dans les compartiments luminal et abluminal.

2.2.1. Mise en culture des CEs

2.2.1.1 Isolement des CEs cérébrales

Les CEs peuvent être isolées directement à partir des microvaisseaux par de nouvelles étapes de centrifugation et/ou filtration pour l'enrichissement en capillaires, suivi d'une digestion enzymatique, pour l'isolement des CEs (Bowman *et al.*, 1981; Coisne *et al.*, 2005; Perrière *et al.*, 2005). Les CEs peuvent ainsi êtreensemencées pour être mises en culture. Afin de s'affranchir des contaminations par d'autres types cellulaires, des méthodes de sélection ont été développées (par exemple, sélection négative par la puromycine, toxique pour les cellules n'exprimant pas la P-gp comme les péricytes (Perrière *et al.*, 2005) ou sélection positive par antigènes grâce à la technique de *fluorescence activated cell sorting* (FACS)). L'enrichissement en capillaires ne permettant pas d'obtenir une préparation contenant 100 % de capillaires, celle-ci reste contaminée par des fragments d'artérioles et de veinules. On parle alors de cultures primaires de CEs d'une fraction de microvaisseaux cérébraux enrichie en capillaires.

Une seconde méthode, excluant la digestion enzymatique, consiste à s'affranchir des autres microvaisseaux par une étape intermédiaire basée sur la liaison sélective des capillaires sur une matrice extracellulaire particulière. Les CEs vont alors migrer des capillaires et former des microcolonies (clones visibles au microscope) qui seront « microtrypsinées » (Méresse *et al.*, 1989). Les clones ainsi isolés sont ensemencés afin d'être mis en culture (Cecchelli *et al.*, 2006). Les CEs obtenues peuvent être congelées en azote liquide pour une utilisation ultérieure. On parle alors de cultures primaires « pures » de CEs de capillaires cérébraux (BCECs).

2.2.1.2. Culture primaire, secondaire ou immortalisée

Il est possible d'effectuer des cultures dites primaires, secondaires si les CEs sont amplifiées (maintenues après plusieurs passages/repiquages), ou encore immortalisées.

Mises en culture (**culture primaire**), les CEs ainsi extraites possèdent leurs caractéristiques *in vivo*. Cependant, une partie de ces caractéristiques est négativement régulée voire perdue, en raison de leur isolement de leur environnement cérébral. Les organismes les plus couramment utilisés pour leur extraction sont le bœuf (Cecchelli *et al.*, 1999; Rubin *et al.*, 1991), le porc (Franke *et al.*, 2000), le rat ou la souris (Abbott *et al.*, 1992; Coisne *et al.*, 2005). Les deux premières espèces possèdent l'avantage de fournir une quantité importante de cellules, d'être facile à obtenir et de permettre la mise en place de **culture secondaire** (les CEs sont repiquées). De nombreux modèles *in vivo* concernent le rat et la souris, faisant du modèle *in vitro* murin, un modèle intéressant pour une comparaison à ces études *in vivo* et pour l'utilisation des nombreux outils moléculaires ainsi disponibles. Il possède cependant un rendement faible. D'autres modèles existent mais sont moins courants pour la

mise en place de modèles de BHE : le macaque (MacLean *et al.*, 2002) et le chat (Fletcher *et al.*, 2006). Le modèle suscitant un intérêt croissant ces dernières années, dans les aspects immunologiques, pathologiques et de variabilités inter-spécifiques, est bien évidemment le modèle humain. L'accès difficile aux tissus humains, la forte variabilité des prélèvements et l'absence de standardisation rendent la mise en place d'un modèle humain primaire difficile mais possible (Bernas *et al.*, 2010; Biegel *et al.*, 1995; Cayrol *et al.*, 2011; Dorovini-Zis *et al.*, 1991).

Dans l'optique de s'affranchir du travail fastidieux de l'isolement des CEs et ainsi faciliter les cultures, des alternatives aux cultures primaires ont été envisagées. **Des lignées cellulaires** ont été établies selon différentes méthodes d'immortalisation (le plus souvent par transfection des CEs primaires par un gène immortalisant) (RBE4, GP8, b-end 3-5, hCMEC/D3, TY08) (Gumbleton and Audus, 2001). À titre d'exemple, la lignée RBE4, bien caractérisée, est issue de CEs cérébrales de rat immortalisées à l'aide d'un plasmide contenant le gène E1A de l'adénovirus (Roux and Couraud, 2005). Les lignées cellulaires présentent les avantages, contrairement à la culture primaire, d'être plus faciles à cultiver, de fournir une plus grande quantité de matériel tout en diminuant le nombre d'animaux sacrifiés. Le développement de lignées humaines est ainsi indispensable afin de pallier les problèmes éthiques, les problèmes matériels de la mise en place de culture primaire mais également afin de s'affranchir des problèmes de spécificité d'espèce. Dans cette optique, différentes lignées de CEs cérébrales humaines immortalisées ont été développées. Parmi celles-ci on retrouve la lignée hCMEC/D3 (Weksler *et al.*, 2005) issue de BCECs humaines immortalisées par le gène de la télomérase humaine et l'antigène du SV40, et plus récemment, la lignée TY08 (Sano *et al.*, 2010) issue de CEs humaines de microvaisseaux cérébraux immortalisées par l'antigène du SV40. Cependant, le principal inconvénient de ces lignées reste la modification du phénotype BHE induit par l'immortalisation et se traduisant souvent par une difficulté à atteindre de faible perméabilité paracellulaire. L'utilisation de rétrovirus et de gène d'immortalisation peut affecter certaines fonctions cellulaires.

Plus récemment, a été établi un modèle de BHE par l'utilisation de cellules souches humaines pluripotentes (hPSCs) induites (Lippmann *et al.*, 2012). Ces cellules sont facilement disponibles et leur mise en culture est relativement simple comparée aux cellules primaires. Les CEs obtenues présentent un phénotype de BHE (jonctions serrées, expression de transporteurs, etc.).

Des lignées cellulaires d'origine non cérébrale sont parfois utilisées pour étudier la perméabilité de la BHE : des cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2) ou rénales de chien (*Madin-Darby-Canine Kidney*, MDCK). Ces lignées sont faciles à cultiver mais restent, malgré la présence de jonctions serrées, très éloignées des CEs cérébrales par leurs

différences morphologiques et structurales (microvillosités, desmosomes, etc.) (Lundquist *et al.*, 2002).

2.2.2. Différents modèles cellulaires

Comme décrit ci-dessus, il est possible d'effectuer une culture primaire, secondaire ou immortalisée de CEs cérébrales extraites de diverses espèces. Ces CEs sont cultivées dans des milieux de culture jusqu'à confluence en fond de boîte de Pétri ou à la surface de filtres (divers matériaux, surface et porosité) recouvert d'une matrice (Bowman *et al.*, 1983). L'utilisation de filtres permet le passage des facteurs solubles et également l'obtention d'un compartiment inférieur (abluminal) et supérieur (luminal) permettant les études de perméabilité de la BHE formée par la monocouche de CEs, ainsi que la mise en culture avec d'autres populations cellulaires. De nombreux modèles ont ainsi été développés (Deli *et al.*, 2005).

Un modèle cellulaire *in vitro* de BHE doit permettre l'obtention d'une monocouche de CEs présentant un phénotype de BHE (présence de jonctions serrées induisant une faible perméabilité paracellulaire aux petites molécules hydrophiles et une TEER élevée ; présence de transporteurs, récepteurs et enzymes spécifiques ; polarisation cellulaire, etc.). Les données issues de ces modèles doivent être reproductibles.

2.2.2.1. Solo-culture

Isolées de leur environnement cérébral, les CEs cérébrales sont mises en culture dans un milieu de culture permettant leur croissance (Abbott *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1983). Ces CEs présentent ainsi plusieurs propriétés morphologiques et biochimiques propres à une BHE (l'expression polarisée d'enzymes, de transporteurs, de récepteurs et des jonctions serrées). Cependant, dans ces conditions les CEs perdent certaines caractéristiques de BHE telles qu'une diminution de l'expression de la P-gp, une perte de l'activité de la γ -GT une augmentation de la perméabilité paracellulaire et une diminution de la TEER (Cecchelli *et al.*, 1999; Dehouck *et al.*, 1990).

Un modèle de solo-culture de CEs cérébrales porcines cultivées en absence de sérum mais en présence d'hydrocortisone a permis d'obtenir une TEER plus élevée et une perméabilité plus faible au saccharose (Franke *et al.*, 2000). L'AMPc ainsi que ses analogues sont également utilisés de la même façon dans certains modèles de BHE (Wegener *et al.*, 2000). Certains auteurs ont aussi utilisé du milieu conditionné de cellules gliales, dont leur implication au sein de la BHE n'est plus à prouver, en présence ou non d'AMPc (Rubin *et al.*, 1991; Siddharthan *et al.*, 2007; Wolburg *et al.*, 1994) ou de milieu conditionné de péricytes (Hori *et al.*, 2004) afin de mimer leur influence et ainsi ré-induire les propriétés de BHE perdues.

Des modèles très simplifiés et miniaturisés émergent notamment pour l'étude à haut débit du passage de composés au travers de la BHE en industrie pharmaceutique. L'un de ces modèles consiste en une culture de BCECs bovines en présence de milieu conditionné de cellules gliales dans un format 24 puits (permettant son utilisation par des systèmes robotisés) et utilisable après seulement 4 jours de culture contre 12 jours pour le modèle initial (Culot *et al.*, 2008). Ce modèle peut maintenant être fourni congelé permettant à l'utilisateur de s'affranchir de l'étape critique de « trypsinisation » des BCECs (Vandenhoute *et al.*, 2012).

2.2.2.2. Co-culture

Comme décrit dans le chapitre I de cette étude bibliographique, la BHE est une unité interactive faisant intervenir plusieurs types cellulaires : les cellules gliales (comprenant les astrocytes), les péricytes et les neurones. Ceci a mené au développement de modèles de culture incluant ces autres types cellulaires. Ces modèles peuvent être syngéniques, c'est-à-dire utilisant des types cellulaires issus de la même espèce, ou non.

La mise en culture de CEs en présence de cellules gliales (de culture primaire ou transformée issues du rat ou de la souris) est à l'origine du plus grand nombre de modèles de BHE en co-culture de par l'implication bien établie des astrocytes au sein de l'UNGV (pour revue, Deli *et al.*, 2005). L'induction des propriétés de BHE, perdues en solo-culture, par la présence de cellules gliales primaires est largement décrite (Abbott *et al.*, 2006; Cecchelli *et al.*, 2007; DeBault and Cancilla, 1980; Deli *et al.*, 2005) mais est cependant moins importante si le modèle utilise des cellules gliales de lignées (Boveri *et al.*, 2005).

La mise en culture de CEs en présence de péricytes a également été réalisée de par la forte proximité de ces deux types cellulaires au sein de la BHE. Une augmentation de la TEER endothéliale et une diminution de la perméabilité paracellulaire des CEs ont été observées en présence des péricytes (Dohgu *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2009). Ces résultats restent cependant controversés (Ruchoux *et al.*, 2002; Thanabalasundaram *et al.*, 2010; Thanabalasundaram *et al.*, 2011).

Les CEs ont aussi été co-cultivées avec des macrophages, induisant une augmentation de la TEER (Zenker *et al.*, 2003), avec des progéniteurs neuraux, induisant une augmentation de la TEER et une diminution de la perméabilité endothéliale à la fluorescéine (Weidenfeller *et al.*, 2007), ou avec des neurones corticaux, induisant l'expression de l'occludine (Cestelli *et al.*, 2001).

2.2.2.3. Tri-culture

Les modèles de tri-cultures tendent à se rapprocher des conditions *in vivo*, et ainsi des interactions au sein de l'UNGV, en réunissant trois populations cellulaires.

Plusieurs modèles de tri-culture CE/astrocytes/neurones (Schiera *et al.*, 2005) et CE/astrocytes/péricytes (Nakagawa *et al.*, 2007; Vandenhoute *et al.*, 2011) existent selon différentes configurations (CEs/astrocytes sur le filtre et neurones/péricytes en fond de puits ou à la face inférieure du filtre, péricytes en fond de puits et astrocytes à la face inférieure du filtre ou *vice versa*, etc.). Selon ces combinaisons, la ré-induction des propriétés de barrière varie et les résultats restent contradictoires d'un laboratoire à l'autre, notamment concernant l'effet des péricytes.

2.2.2.4. Tranches organotypiques

Afin de cultiver les CEs en présence de tous les types cellulaires présents dans le parenchyme cérébral, des équipes ont cultivé des CEs avec des tranches organotypiques cérébrales. Les CEs sont soit cultivées sur la face inférieure du filtre qui est lui-même recouvert d'une tranche d'hippocampe (Duport *et al.*, 1998), soit directement recouvertes d'une tranche de cortex (Zehendner *et al.*, 2009). Le premier modèle a montré la présence de jonctions serrées fonctionnelles et permet l'étude, grâce à des électrodes, de l'effet de molécules sur l'activité électrique neuronale suite à leur passage au travers de la BHE. Le second modèle a été caractérisé en termes d'expression des jonctions serrées et d'impédance et est utilisé en conditions ischémiques.

2.2.2.5. Modèles dynamiques













Afin de se rapprocher encore plus des conditions *in vivo*, des modèles faisant intervenir de nouveaux éléments non cellulaires, pouvant influencer le phénotype BHE des CEs ont été mis en place. Les CEs peuvent ainsi être exposées à un flux intraluminal unidirectionnel (assuré par un cône ou une pompe) afin de prendre en considération les contraintes de cisaillement créées par le flux sanguin à la surface des CEs. Ce flux intraluminal est à l'origine de signaux extracellulaires auxquels de nombreuses protéines membranaires (mécanosenseurs) seront sensibles (telles que les intégrines) pouvant conduire à l'activation de différentes voies de signalisation (Ando and Yamamoto, 2009).

Le premier système consiste en la culture de CEs sur une plaque exposée aux contraintes de cisaillement à l'aide du milieu de culture et d'un cône rotatif (appareil cône-plaque) (Dewey *et al.*, 1981). Ce dispositif n'est cependant pas adapté pour reproduire

précisément le flux sanguin et ne permet pas de créer une force homogène le long de la monocouche de CEs.

D'autres modèles ont depuis vu le jour. Par exemple, le modèle *dynamic in vitro BBB model* (DIV-BBB) (Stanness *et al.*, 1996) consiste à ensemercer les CEs à l'intérieur de fibres creuses (face luminale) et les cellules gliales sur la surface externe des fibres (face abluminale) au sein d'un compartiment permettant les échanges gazeux et alimenté en milieu de culture. Ceci permet d'obtenir une structure similaire à un capillaire avec une pression intraluminale comparable à celle mesurée *in vivo*. La mise en place de ce modèle dynamique est délicate et est difficilement utilisable pour les études pharmaceutiques à haut débit (Marroni *et al.*, 2003) mais il permet l'induction des propriétés de BHE au niveau des CEs et notamment une augmentation de l'expression de protéines des jonctions serrées et adhérentes (Cucullo *et al.*, 2011).

Tableau II : Récapitulatif des principales techniques pour l'étude de la BHE et de leurs intérêts.

				Avantages	Utilisations	Limites	Références	
Modèles <i>in vivo</i>	Etudes non invasives	Tomographie par émission de positons	 Mazoyer <i>et al.</i> , 2002	Technique puissante (plusieurs informations) / Rapide / Reproductible / Sensible / Utilisable chez l'homme	Evaluation de la distribution d'un traceur (molécule d'étude) dans le cerveau en temps réel / Intégrité de la BHE	Etude du transport de molécule possible mais lourd à moyen ou haut débit / Usage limité (demi-vie très courte des radio-éléments) / Coût / Distinction métabolites-composé initial, fraction libre ou liée / Etude des interactions cellulaires et moléculaires impossibles	Mazoyer, 2002	
		Imagerie par résonance magnétique	 Mazoyer <i>et al.</i> , 2002	Aucune irradiation / Sensible / Très haute résolution/ Utilisable chez l'homme	Détection et observation de la progression des lésions de la BHE / Intégrité de la BHE / Etude de paramètres (flux sanguin cérébral, etc.)	Coût / Agent de contraste / Etude des interactions cellulaires et moléculaires impossibles	Kassner et Thornhill, 2011	
	Etudes invasives	Perfusion intraveineuse	 Mensch <i>et al.</i> , 2009	Mise en œuvre facile / Evaluation préliminaire rapide / Pas de chirurgie lourde	Etude du passage de molécules à travers la BHE / Cinétique	Nombre d'animaux / Métabolisme des organes périphériques ou fixation aux protéines plasmatiques / Etude des interactions cellulaires et moléculaires impossibles	Mayer <i>et al.</i> , 1959	
		Indice d'absorption cérébrale	 Mensch <i>et al.</i> , 2009	Mise en œuvre facile / Pas de métabolisme des organes périphériques	Etude du passage de molécules à travers la BHE / Cinétique	Sensible pour les composés à faible perméabilité / 80% du composé injecté atteint la carotide externe / Etude des interactions cellulaires et moléculaires impossibles	Oldendorf, 1970	
		Perfusion cérébrale <i>in situ</i>	 Mensch <i>et al.</i> , 2009	100% du perfusé atteint l'artère carotide interne	Etude du passage de molécules à travers la BHE (vitesse) / Etude des effets de facteurs (pH, pression osmotique, etc.)	Mise en œuvre difficile / Etude des interactions cellulaires et moléculaires impossibles	Takasato <i>et al.</i> , 1984	
		Microdialyse intracérébrale	 Mensch <i>et al.</i> , 2009	Mesure de la concentration cérébrale libre / Comparaison des résultats selon la localisation de la sonde dans le parenchyme	Etude du passage de molécules à travers la BHE / Cinétique	Mise en œuvre difficile et limitée / Technique invasive / Etude des interactions cellulaires et moléculaires impossibles	Aasmundstad <i>et al.</i> , 1995 Westergren <i>et al.</i> , 1995	
		Coupes cérébrales		Distribution visuelle du traceur / Résolution	Distribution et quantification de composés	Etude des interactions cellulaires et moléculaires limités	Solon, 2012; Takai <i>et al.</i> , 2012	
	Modèles <i>in silico</i>			Estimation rapide / Coût	Prédiction de la perméabilité de composés à travers la BHE (diffusion passive) / criblage initial	Diffusion passive uniquement / Faible pertinence	Smith, 2003; Mehdi pour et Hamidi, 2009	
	Modèles <i>in vitro</i>	Modèles non cellulaires	Membrane artificielle immobilisée et <i>Parallel artificial membrane permeability assays</i>	 Mason, 2009	Technique simple	Prédiction de la perméabilité de composés à travers la BHE (diffusion passive)	Absence des propriétés dynamiques des membranes biologiques / Une seule monocouche phospholipidique / Diffusion passive uniquement	Reichel et Begley, 1998; Di <i>et al.</i> , 2003;
		Microvaisseaux isolés		 Méresse <i>et al.</i> , 1989	Proche des conditions <i>in vivo</i>	Etude des propriétés de la BHE / Etude de transport	Découplage des chaînes respiratoires mitochondriales / Compartiment luminal difficilement accessible	Joó, 1985
Modèles cellulaires		Culture primaire et secondaire	 Solo-culture	Obtention facile / Nombreuses caractéristiques de la BHE <i>in vivo</i> conservées	Etude de transport / Etudes physio-pathologiques / Etude des interactions cellulaires et moléculaires / Etude de l'influence d'autres types cellulaires (solo-culture, co-culture, tri-culture, milieu conditionné, tranches organotypiques)	Besoin de réinduire certaines propriétés de BHE / Rendement d'extraction faible / Accès aux tissus humains encore difficiles / Temps de mise en place et maintien	Bowman <i>et al.</i> , 1981; Méresse <i>et al.</i> , 1989	
		Lignée cellulaire	 Co-culture Pottiez <i>et al.</i> , 2011; Vandehauts <i>et al.</i> , 2012	Culture facile / Grande quantité de matériel / Lignée humaine		Perméabilité paracellulaire relativement élevée	Gumbleton et Audus, 2001	
		Modèle dynamique	 Cucullo <i>et al.</i> , 2011	Prise en compte des contraintes de cisaillement du flux intraluminal / Proche des conditions régnant <i>in vivo</i>		Etude de l'effet du flux / Etudes physio-pathologiques / Etude des interactions cellulaires et moléculaires / Etude de l'influence d'autres types cellulaires (solo-culture, co-culture)	Mise en place délicate	Stanness <i>et al.</i> , 1996

Les techniques les plus adaptées et les moins délicates pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires sont représentées en rose.

3. Choix d'un modèle d'étude adéquat pour l'étude des protéines des CEs de BHE

3.1. Quel type de modèle choisir ?

De multiples enjeux, à l'origine de la mise en place de nombreux modèles, existent pour l'étude de la BHE. La modélisation de la BHE dépend des contraintes inhérentes à la technique d'analyse utilisée et dépend également de ce que l'on veut en faire (Tableau II) (Cecchelli *et al.*, 2007). Bien que la BHE puisse être appréhendée de l'animal jusqu'à la cellule, la recherche des variations moléculaires affectant un type cellulaire donné est difficile à réaliser voire impossible *in vivo* du fait de la contamination par les tissus environnants en l'absence de moyens d'extraction adéquats. Dès lors, parce qu'elles permettent de contrôler l'homogénéité tissulaire, les approches *in vitro*, beaucoup plus « maniables », semblent être mieux adaptées.

Afin de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques, les modèles *in vitro* de BHE les plus appropriés, les plus « maniables » et les plus maîtrisés sont les modèles de co-culture. L'influence des astrocytes sur l'acquisition du phénotype BHE des CEs a été largement décrite dans la littérature (pour revues, Abbott, 2002; Abbott *et al.*, 2006; Abbott *et al.*, 2010). L'utilisation de systèmes de cultures primaires ou secondaires, en présence d'astrocytes, est une manière simple de ré-induire les propriétés de BHE des CEs.

L'efficacité de cette ré-induction peut être évaluée par la caractérisation des propriétés physiques et métaboliques de la monocouche de CEs : (i) par la mesure de la perméabilité endothéliale (mesure directe de la perméabilité d'un composé, molécule hydrophile de petite taille non substrat d'un transporteur passant très faiblement au travers de la BHE (marqueur d'intégrité) ou mesure de la TEER) et (ii) par la détection des marqueurs moléculaires spécifiques de CEs de BHE (par microscopie ou par des techniques de biologie moléculaire et de biochimie). Des études de corrélation peuvent également être effectuées afin de déterminer le degré de corrélation entre la prédiction calculée *in vitro* et les données obtenues *in vivo*.

3.2. Modèle *in vitro* de BHE développé au laboratoire

Établi depuis plus de 22 ans, le modèle non syngénique *in vitro* de BHE développé dans notre laboratoire consiste en une co-culture, de part et d'autre d'un filtre, de BCECs bovines (Méresse *et al.*, 1989) en présence de cellules gliales extraites de rats nouveaux nés [composées d'astrocytes ($\approx 60\%$), de cellules microgliales et d'oligodendrocytes] (Dehouck *et al.*, 1990) (Figure 2). Les cellules gliales ont initialement étéensemencées de part et d'autre du filtre et sont aujourd'hui ensemencées en fond de puits à distance des CEs afin de faciliter les conditions de culture et d'expérimentation. Le même effet étant observé, le phénomène d'induction fait bien intervenir la sécrétion de facteurs solubles.

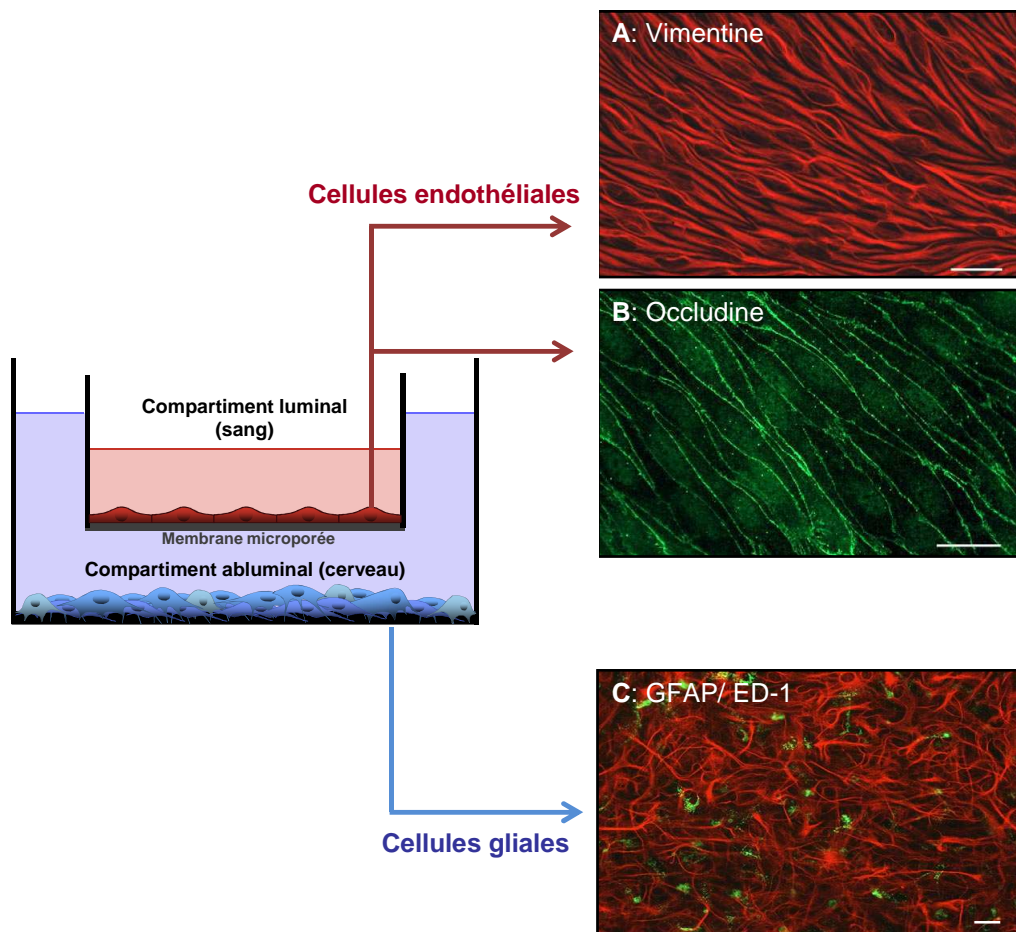


Figure 7 : Modèle *in vitro* de BHE du laboratoire.

Les BCECs bovines sont isolées (Méresse *et al.*, 1989) puis cultivées sur un insert recouvert de gel de collagène de queue de rat. Les cellules primaires gliales de rat sont cultivées en fond de puits. Le compartiment supérieur mime ainsi le compartiment sanguin (luminal) et le compartiment inférieur, le compartiment cérébral (système nerveux central, SNC) (abluminal). L'immunocytochimie de la vimentine (A) (cytosquelette) et de l'occludine (B) (jonctions serrées) permet de visualiser la monocouche confluite de CEs ainsi que la localisation péricellulaire des jonctions serrées. L'immunocytochimie de la *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) et de l'ED-1 (C) permet la visualisation des astrocytes et des cellules microgliales, respectivement. La barre d'échelle représente 25 μ m. Figure adaptée de Cecchelli *et al.*, 2007.

La ré-induction du phénotype BHE intervient après 12 jours de co-culture, comme le montre la forte corrélation retrouvée entre les CEs co-cultivées *in vitro* et les CEs *in vivo* (Cecchelli *et al.*, 1999). Brièvement, les CEs présentent une TEER fortement augmentée, une absence de fenestration, un renforcement des jonctions serrées, une augmentation du nombre de mitochondries et une perméabilité vis-à-vis de différents composés proche de la situation *in vivo*. La barrière métabolique est également ré-induite par la co-culture puisque l'activité enzymatique de la γ -GT est retrouvée (Dehouck *et al.*, 1990). Des récepteurs et transporteurs spécifiques sont aussi exprimés : récepteur aux LDLs (Dehouck *et al.*, 1994), récepteur de la transferrine (Descamps *et al.*, 1996) et P-gp (Cecchelli *et al.*, 1999; Fenart *et al.*, 1998). Ce modèle de co-culture est un outil précieux complètement maîtrisé permettant de disposer de grandes quantités de CEs différenciées au phénotype de BHE.

La complexité de la BHE, tant sur les plans structurel et fonctionnel, a incité les chercheurs à développer de nombreux modèles d'étude. La grande variété de ces modèles de BHE résulte d'un besoin croissant d'obtention d'informations. Chaque modèle est ainsi développé dans le cadre d'une thématique précise et ainsi adapté à une ou plusieurs étude(s) particulière(s) en fonction de leurs avantages et inconvénients. Les modèles *in silico* apparaissent généralement en premier lors d'un programme de recherche, suivi des modèles cellulaires *in vitro* souvent complémentaires ou précédant les modèles *in vivo*.

Certes limités, les modèles cellulaires *in vitro* présentent l'avantage de reproduire l'endothélium cérébral en limitant les obstacles de l'*in vivo* (complexité, coût et problème éthique). Le modèle *in vitro* de BHE développé au sein du laboratoire du Pr Cecchelli est utilisé pour plusieurs types d'études : la prédiction de la pénétration cérébrale de composés (Cecchelli *et al.*, 1999; Dehouck *et al.*, 1992; Lundquist *et al.*, 2002), l'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires (études mécanistiques) en conditions physiologiques (Berezowski *et al.*, 2004a; Candela *et al.*, 2008; Candela *et al.*, 2010; De Bock *et al.*, 2012; Gosselet *et al.*, 2009; Pottiez *et al.*, 2011) ou pathologiques (conditions inflammatoires (Descamps *et al.*, 1997; Descamps *et al.*, 2003), ischémiques (Brillault *et al.*, 2002; Culot *et al.*, 2009; Plateel *et al.*, 1995) ou hypercholestérolémiques (Saint-Pol *et al.*, 2012)). Ce modèle *in vitro* de BHE est par ailleurs reconnu comme étant l'un des modèles *in vitro* les plus pertinents (Haberman, 2008; Mertsch K. and Maas J., 2002).

Chapitre III

Approches protéomiques globales, comparatives et quantitatives

Sommaire

1. Spectrométrie de masse	- 68 -
2. Quantification sur protéine intacte par gel d'électrophorèse.....	- 71 -
2.1. Principe de l'électrophorèse.....	- 71 -
2.2. Visualisation des protéines pour leur quantification « en gel »	- 74 -
2.3. Avantages et limites des analyses électrophorétiques	- 75 -
3. Quantification des protéines <i>via</i> l'analyse des peptides par spectrométrie de	
masse	- 76 -
3.1. Séparation des protéines pour la simplification des échantillons	- 76 -
3.2. Séparation des peptides	- 77 -
3.3. Quantification des protéines à partir des peptides.....	- 79 -
3.4. Avantages et limites de la quantification sur peptides	- 93 -

La capacité à distinguer les différences significatives qui existent entre deux états cellulaires (état physiologique vs état pathologique, état stimulé par une molécule exogène ou non, cellules dont l'environnement est modifié, etc.) est une approche universelle en vue de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces processus, de découvrir de nouveaux marqueurs diagnostiques et/ou de découvrir de nouveaux agents thérapeutiques. Dans notre étude, la comparaison par approche protéomique des deux conditions de culture décrites dans le chapitre II (BCECs cultivées seules et BCECs cultivées en présence de cellules gliales), devrait nous permettre de définir les acteurs de la différenciation cellulaire, induits par les cellules gliales et responsables du phénotype BHE.

En assurant la majeure partie des diverses fonctions cellulaires, les protéines sont les principales actrices du vivant et sont ainsi étroitement liées au phénotype des cellules. Le concept de protéome, décrit par Wilkins (Wilkins *et al.*, 1996), désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme entier à un instant donné et dans un état physiologique donné. L'analyse du protéome, appelée protéomique (Anderson and Anderson, 1998; Tyers and Mann, 2003), est applicable à l'étude des protéines présentes dans de nombreux types de matériels biologiques. Ces protéines présentent une gamme de concentration très étendue, entre les protéines minoritaires et les protéines majoritaires (allant jusqu'à un facteur 10^9 à 10^{10} pour le plasma) (Rabilloud, 2002). En raison des diverses régulations transcriptionnelles, mais également traductionnelles et post-traductionnelles, que les protéines subissent, le niveau d'expression des ARN messagers (ARNm) ne peut être corrélé ni à la quantité, ni à la diversité des protéines. Cependant, comparativement à la PCR pour les acides nucléiques, aucune technique d'amplification des protéines n'existe à ce jour. De plus, en protéomique, il n'existe pas de méthode capable, en une seule étape, d'aboutir à l'identification et la quantification de toutes les protéines d'un échantillon complexe. Les approches protéomiques se composent ainsi de quatre phases clefs qui consistent (i) à préparer l'échantillon et les protéines d'intérêt, (ii) à séparer ces dernières pour en résoudre l'hétérogénéité, (iii) à les quantifier et (iv) à les identifier/caractériser (Bodzon-Kulakowska *et al.*, 2007) (Figure 8).

La préparation des échantillons est une étape fondamentale pour l'obtention de résultats corrects, fiables et reproductibles. Idéalement, cette préparation doit permettre de solubiliser toutes les protéines d'un échantillon (sans provoquer de modifications chimiques de ces dernières) tout en éliminant les autres composés dits « contaminants » (acides nucléiques, polysaccharides, polyphénols, lipides, etc.) et en restant compatible avec les analyses ultérieures. Cependant, il n'existe pas de protocole universel « parfait » de préparation d'échantillon (Rabilloud and Lelong, 2011) mais des protocoles plus ou moins adaptés selon l'échantillon de départ et le but de l'étude.

L'étape de séparation peut se faire directement au niveau protéique et/ou au niveau peptidique, après digestion enzymatique des protéines. La séparation des protéines ou des peptides peut être envisagée de deux façons : une première approche dite « en gel » qui repose sur l'électrophorèse et une seconde dite « hors gel » qui repose principalement sur la chromatographie. Dans l'optique d'une étude protéomique différentielle globale, les techniques les plus couramment utilisées restent l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) pour la séparation des protéines et la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour la séparation des peptides (Aebersold and Mann, 2003).

La quantification des protéines est envisageable pour ces deux approches. L'utilisation d'isotopes radioactifs pour la quantification des protéines a été l'une des premières techniques utilisées. Cependant, malgré sa très bonne sensibilité, elle présente de nombreux inconvénients, dont un coût élevé ainsi qu'un suivi pointu des règles d'utilisation et de recyclage, liés aux risques de la radioactivité. Ainsi ces dernières années, l'utilisation d'autres types de marqueurs a fait son apparition parmi les méthodes de quantification. La quantification « en gel » peut se faire par visualisation d'une intensité de coloration engendrée par fixation, covalente ou non covalente, de chromophores ou fluorophores sur les protéines. La quantification des protéines « hors gel » se fait en spectrométrie de masse. Pour ce faire, pendant l'étape de préparation, les protéines ou peptides peuvent être soit non marqués (technique *label free*), soit marqués par des isotopes stables.

Quelle que soit l'approche protéomique mise en place, **l'identification** des protéines se fait toujours par spectrométrie de masse.

Outre les approches « en gel » ou « hors gel », deux grandes stratégies se sont imposées au fil du temps. Ces dernières reposent sur la manière d'identifier les protéines d'intérêt et sur le degré d'information recherché relatif à ces protéines. La méthode *bottom-up* est historiquement la plus ancienne et repose sur l'analyse par spectrométrie de masse des peptides issus d'une digestion enzymatique des protéines. Elle permet majoritairement d'identifier les protéines. Beaucoup plus récente, la méthode *top-down* est basée sur l'analyse par spectrométrie de masse de protéines entières (Siuti and Kelleher, 2007). Cette dernière est une méthode ciblée permettant également d'identifier les protéines mais surtout de caractériser plus aisément les isoformes protéiques, les MPTs ou de réaliser une étude structurale. Elle nécessite néanmoins de grandes quantités de matériels. Dès lors la stratégie de choix pour une étude différentielle globale des protéines comme nous souhaitons mettre en place reste la méthode *bottom-up*.

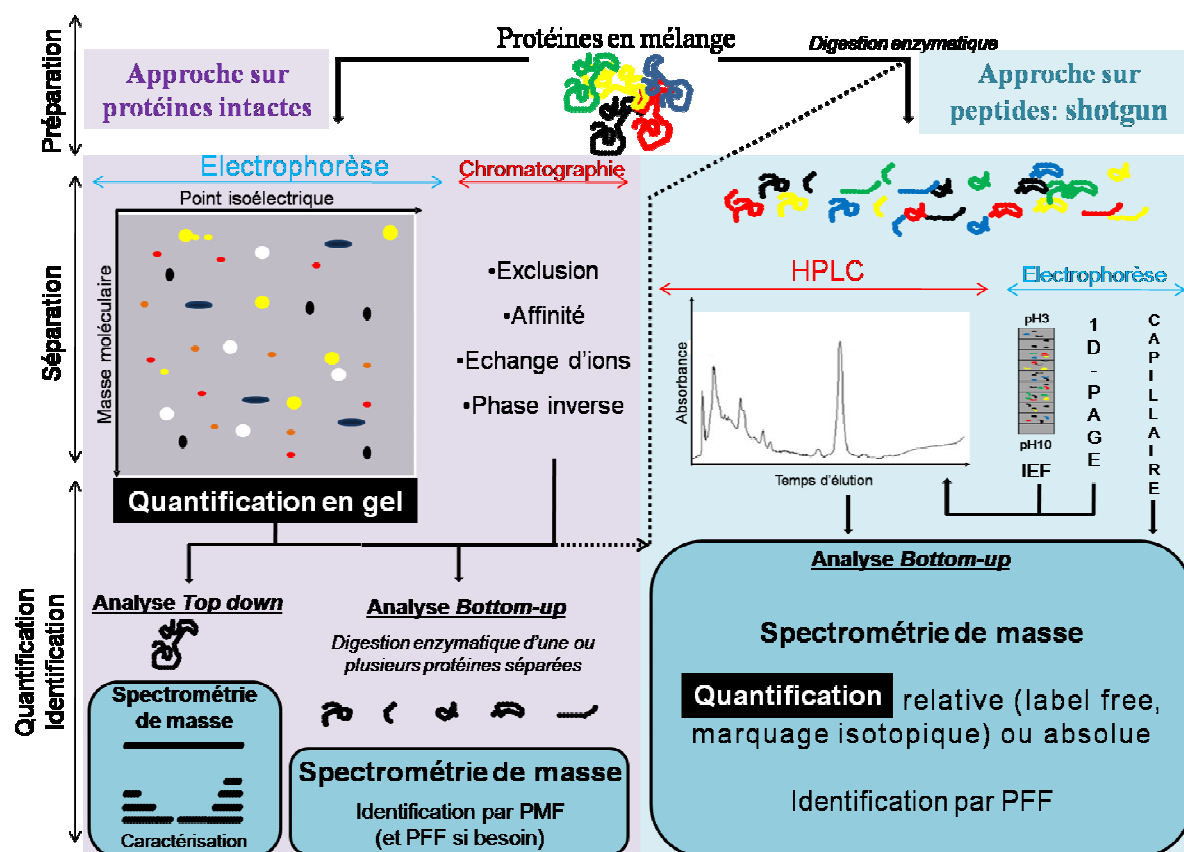


Figure 8 : Schéma représentant les techniques les plus couramment employées en vue d'une analyse protéomique comparative et quantitative.

Une analyse protéomique se compose d'une étape de préparation de l'échantillon, d'une étape de séparation, d'une étape de quantification et d'une étape d'identification des protéines. La séparation des échantillons peut se faire au niveau protéique ou peptidique par électrophorèse ou chromatographie. La stratégie *top down* consiste à analyser directement une protéine en spectrométrie de masse afin de mieux la caractériser. La stratégie *bottom-up* consiste quant à elle à analyser par spectrométrie de masse les peptides issus d'une digestion enzymatique d'une protéine isolée ou d'un mélange de protéines. Alors que la quantification peut se faire « en gel » ou par spectrométrie de masse, l'identification des protéines se fait toujours par spectrométrie de masse. HPLC, chromatographie liquide haute performance ; IEF, isoélectrofocalisation ; PAGE, électrophorèse en gel de polyacrylamide ; PMF, empreinte peptidique massique ; PFF, empreinte de fragmentation peptidique.

Ce troisième chapitre de l'étude bibliographique met en avant les différentes techniques de séparation et de quantification des protéines et des peptides, dans l'optique d'une analyse protéomique différentielle globale. Seules les techniques les plus couramment utilisées, en excluant la radioactivité, sont abordées.

1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse, inventée par Thomson en 1912, consiste en une mesure très précise de la MM de molécules isolées ou en mélange (ou plus précisément de leur rapport de masse sur charge (m/z)). Quel que soit le spectromètre de masse, les molécules à analyser

sont ionisées et transférées en phase gazeuse. Après accélération des ions dans une direction de l'espace, le rapport de m/z des ions ainsi formés est alors déterminé par la mesure du temps mis pour parcourir une distance donnée dans un espace vide de champ (temps de vol) ou par la trajectoire des ions dans un champ électrique et/ou magnétique dynamique ou statique. Un spectromètre de masse se compose ainsi de trois parties : une source d'ions qui à partir des molécules à analyser et d'un apport énergétique produira des analytes gazeux électriquement chargés (ions), un analyseur qui triera les ions selon leur rapport de m/z en étudiant leur trajectoire et un détecteur qui associera à un rapport de m/z donné la détection et la quantification des ions par l'intermédiaire du courant électrique généré lors de l'impact des ions sur la surface métallique du détecteur. Les signaux électriques formés sont ensuite transformés en information numérique, traités et stockés comme données informatiques. Ces signaux sont ainsi visualisés sous forme de spectre de masse dans lequel l'intensité du signal est mise en relation avec le rapport de m/z (Figure 9).

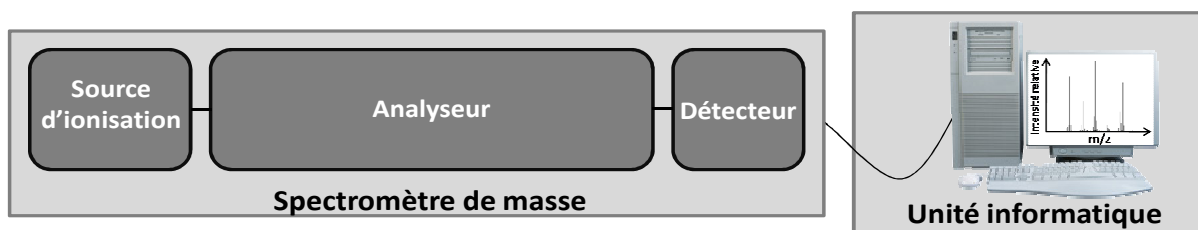


Figure 9 : Schéma général d'un spectromètre de masse

Un spectromètre de masse se compose de trois parties : une source d'ions, un analyseur et un détecteur. Ces dernières sont cependant toujours associées à l'informatique pour la conversion des signaux électriques en signaux informatiques et pour le traitement et le stockage des données, ce qui en fait une partie indissociable du spectromètre de masse. m/z , masse sur charge.

Nées au début du vingtième siècle du besoin de détecter et quantifier les atomes, les technologies de spectrométrie de masse pour l'analyse des biomolécules ne se sont développées que depuis une vingtaine d'années en raison de l'obstacle que constituait la taille imposante de ces biomolécules. Le choix d'un type de spectromètre de masse va dépendre de la stratégie protéomique choisie, de l'approche envisagée et des informations souhaitées. Globalement, en protéomique deux types de sources sont utilisées pour gazéifier et ioniser de façon douce les protéines ou les peptides : la source électrospray (Fenn *et al.*, 1989; Yamashita and Fenn, 1984) (John Fenn, prix nobel de chimie en 2002) et la source d'ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI, *Matrix-assisted laser desorption/ionization*) (Karas and Hillenkamp, 1988; Karas *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1988) (Koichi Tanaka, prix nobel de chimie en 2002). La source électrospray est une source continue qui consiste en l'ionisation des composés en solution permettant son couplage direct avec les techniques de séparation en phase liquide (chromatographie et électrophorèse liquide) ou en phase gazeuse (chromatographie en phase gazeuse). La source MALDI est une source non continue (ionisation par pulse d'énergie) en phase solide, qui quant à elle, permet la désorption et

l'ionisation sous l'impact d'un pulse laser, de composés co-cristallisés avec un large excès de matrice (petite molécule chimique souvent aromatique, acide ou basique, capable d'absorber l'énergie du laser et de la transférer aux analytes pour permettre leur passage en phase gazeuse).

Les analyseurs de masse utilisés dans le cadre d'approches protéomiques peuvent être des trappes ioniques plus ou moins complexes (trappe ionique (*ion trap*, IT), analyseurs à transformée de Fourier (*Orbitrap*TM (OT) et à résonance cyclotronique d'ions (FT-ICR))), des temps de vol (*time-of-flight*, TOF), des quadripôles (*quadrupole*, Q), chacun possédant des forces et des faiblesses (pour revue, Aebersold and Mann, 2003). Ils peuvent être utilisés en mode simple (mode MS, mesure du rapport de m/z du composé ionisé) ou en tandem, c'est-à-dire combinés entre eux (appareils hybrides) (mode MS/MS, mesure du rapport de m/z des ions fragments du composé ionisé). La sensibilité, la résolution, la gamme de masse, la vitesse de balayage et la précision de masse sont des paramètres relatifs à l'analyseur.

Deux modes d'analyse sont ainsi possibles en spectrométrie de masse : un mode permettant la mesure précise du rapport de m/z des peptides (mode MS) et un mode permettant d'effectuer le séquençage des peptides par fragmentation physique (mode MS/MS ou spectrométrie de masse en tandem). Dans le cas d'une analyse de peptides issus d'une même protéine, typiquement en analyse 2-DE, l'identification d'une protéine se fera majoritairement par établissement, *via* le mode MS, de l'empreinte peptidique massique (*peptide mass fingerprint*, PMF) de la protéine (mesure des rapports de m/z des différents peptides générés) après action d'une protéase spécifique (les protéases à spécificité étroite comme la trypsine engendrent toujours les mêmes peptides pour une protéine donnée) (Henzel *et al.*, 1993; James *et al.*, 1993; Mann *et al.*, 1993; Pappin *et al.*, 1993; Yates *et al.*, 1993). Dans le cas d'une analyse de peptides issus de protéines en mélange, typiquement en analyse HPLC, l'identification se fera exclusivement par établissement du profil de fragmentation des peptides (empreinte de fragmentation peptidique ou *peptide fragmentation fingerprint* (PFF)) grâce au mode MS/MS (mesure des rapports de m/z des différents fragments du peptide) (Blueggel *et al.*, 2004). En effet, compte tenu de la multitude de peptides générés, l'identification par PMF ne peut être qu'infructueuse en raison de la superposition des empreintes peptidiques et des phénomènes de suppression de signal. Les peptides doivent donc être fragmentés afin d'en déterminer tout ou une partie de leur séquence et ainsi identifier les protéines initialement présentes. Les informations de masse (listes de masses expérimentales) obtenues par PMF ou PFF sont alors confrontées à leur homologues théoriques prédits *in silico* à partir des séquences de toutes les protéines et peptides répertoriées dans une banque de données protéique pertinente (Apweiler *et al.*, 2004). Ces comparaisons se font par l'intermédiaire de logiciels informatiques (algorithme de recherche et d'identification en base de données) tels que Profound, MS-FIT, Mascot, Sequest, X!Tandem

ou OMSSA (Nesvizhskii *et al.*, 2007). La concordance des PMF ou PFF théoriques et expérimentaux permet de remonter à l'identité de la ou des protéines.

Développées pour l'identification de séquences présentes dans les banques de données protéiques, ces méthodes ne permettent cependant pas d'identifier des protéines ou peptides provenant d'organismes non séquencés (mis à part par homologie) ou contenant des MPTs complexes. Pour ces protéines ou peptides, le mode MS/MS permet leur séquençage *de novo* et ainsi la déduction de leur séquence en acides aminés à partir des différences de masses entre les ions fragments successifs. Il est alors possible d'identifier des peptides modifiés ou provenant d'organismes non séquencés.

2. Quantification sur protéine intacte par gel d'électrophorèse

2.1. Principe de l'électrophorèse

La technique d'électrophorèse a été imaginée par Linder et Picton en 1892 puis adaptée au fil des années. L'électrophorèse en gel, dite électrophorèse de zone, utilise un support poreux dans lequel les protéines chargées migrent selon leurs propriétés physico-chimiques dans un milieu électrolytique conduisant le courant et sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines d'un échantillon peuvent ainsi être « plus ou moins » séparées les unes des autres. Deux types d'électrophorèse en gel existent : l'électrophorèse en conditions dénaturantes (présence de sodium dodecylsulfate (SDS), agent dénaturant anionique qui va charger négativement toutes les protéines et permettre leur séparation selon leur MM uniquement) et l'électrophorèse en conditions non dénaturantes (natives) (permettant de conserver la structure native des protéines pour préserver leurs interactions avec d'autres molécules ou étudier leurs activités). L'électrophorèse en conditions dénaturantes, de par sa meilleure résolution, est la technique de choix lorsque seule une identification des protéines est recherchée.

La technique la plus simple, consiste en la séparation des protéines selon leur MM (électrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide, 1D-PAGE en présence de SDS). Le gel est constitué de polymères (polyacrylamide) dont les proportions d'acrylamide et bis-acrylamide sont modifiées pour jouer sur la réticulation de celui-ci. Un gel fortement réticulé est plus adapté à la séparation des petites protéines alors qu'un gel de faible réticulation laissera plus facilement migrer les protéines de haute MM. Cette technique est appropriée pour des échantillons purifiés ou décomplexifiés mais n'apporte qu'une notion de contrôle (de la composition de l'échantillon), de par son faible pouvoir résolutif, ou de pré-fractionnement dans le cas des échantillons complexes.

L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE ou 2D-PAGE pour électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide) consiste dans un premier temps en la séparation des protéines selon leur point isoélectrique (pI) puis dans un second temps selon leur MM

(Görg *et al.*, 2004; O'Farrell, 1975). Cette technique offrant deux dimensions de séparation est beaucoup plus résolutive et donc adaptée aux échantillons complexes. Les protéines se retrouvent isolées ou presque les unes des autres, sous forme de spots, permettant ainsi une analyse plus aisée et plus sûre. Pour les gels les plus résolutifs, il est possible d'y visualiser jusqu'à 2000 spots.

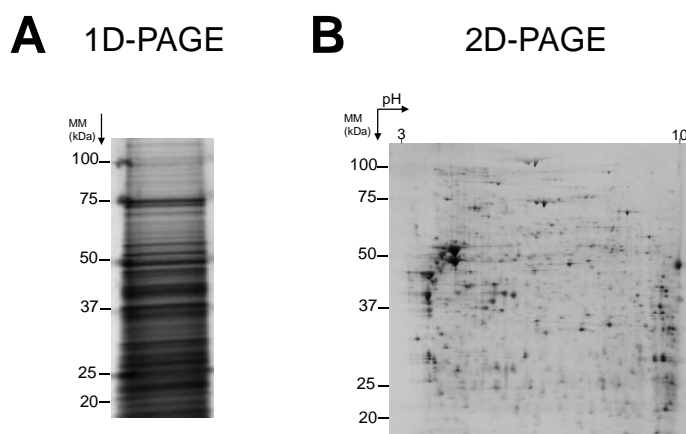


Figure 10 : Illustrations et comparaison de la 1D-PAGE et de la 2D-PAGE.

Images obtenues après numérisation (A) d'un gel d'électrophorèse à une dimension (1D-PAGE) et (B) d'un gel d'électrophorèse à deux dimensions (2D-PAGE), en condition dénaturante, d'un même extrait protéique de BCECs. La coloration au nitrate d'argent permet d'évaluer la répartition des protéines (A) en fonction de leur masse moléculaire (MM) uniquement ou (B) en fonction de leur point isoélectrique et de leur MM (données non publiées).

L'électrophorèse réalisée selon le système de Laemmli est la technique la plus couramment utilisée (Laemmli, 1970). Plusieurs variantes de ce système électrophorétique existent et sont adaptables à l'analyse d'échantillons « particuliers » quand l'électrophorèse classique s'avère insuffisante (Rabilloud and Lelong, 2011). Afin de jouer sur la séparation des protéines, il est possible d'utiliser des gels en gradient de polyacrylamide (pour séparer des protéines de MM très différentes), d'utiliser d'autres polymères, mais également de modifier le pH du tampon du gel. Une baisse du pH du tampon du gel de séparation permet de jouer sur la vitesse de la fraction mobile et ainsi d'augmenter la résolution des protéines de hautes MM au détriment d'une baisse de résolution pour les protéines de faibles masses, et inversement. De manière générale, le rendement d'une 2D-PAGE est compris entre 25 et 50 % (protéines présentes/protéines séparées). En effet, certaines protéines ont tendance à précipiter à leur pI et beaucoup d'entre elles restent alors piégées dans le gel de première dimension (notamment les protéines hydrophobes).

Une étape de détection des protéines dans le gel est indispensable avant l'étape d'identification par spectrométrie de masse. Pour ce faire, trois grands types de visualisation des protéines « en gel » existent : la coloration à l'argent, la coloration à l'aide de colorants organiques (typiquement le bleu de Coomassie) et la fluorescence (Riederer, 2008). Ces

méthodes de détection diffèrent par leur sensibilité, leur linéarité, leur homogénéité et leur compatibilité avec la spectrométrie de masse. L'intensité de coloration des spots de gels provenant d'extraits protéiques issus d'états cellulaires différents est comparée par densitométrie. Des logiciels spécifiques permettent d'obtenir une quantification relative des spots et donc de la (ou des) protéine(s) concernée(s). Les protéines présentes dans les spots d'intérêt sont alors identifiées par spectrométrie de masse après découpe des spots correspondants et digestion enzymatique des protéines.

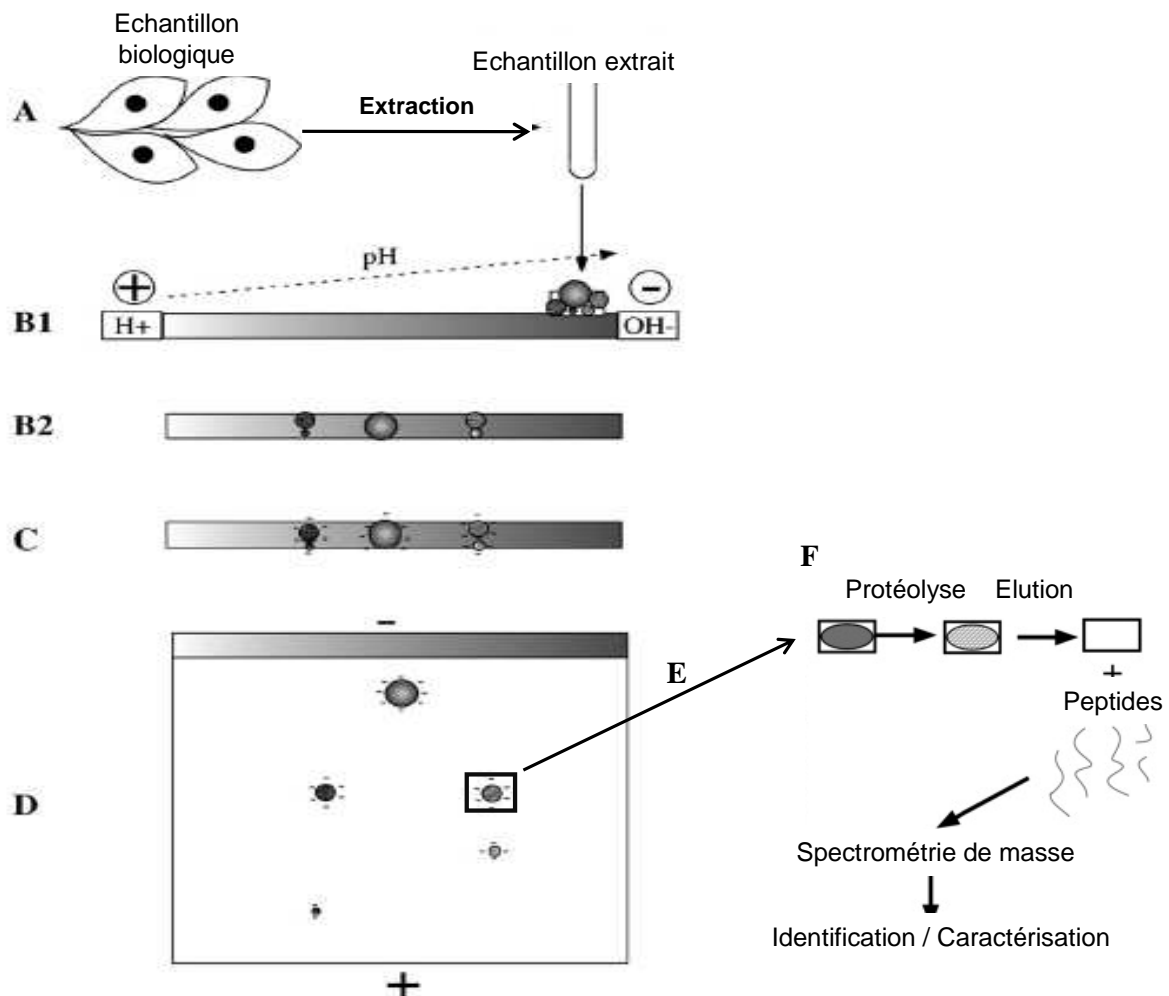


Figure 11 : Principe de la 2D-PAGE conventionnelle.

(A) Les protéines sont extraites de l'échantillon à analyser puis (B1) déposées en première dimension sur le gel d'isoélectrofocalisation (IEF) possédant un gradient de pH. (B2) Les protéines, soumises à un champ électrique migrent alors jusqu'à leur pI. (C) La bandelette de la première dimension est équilibrée dans un tampon contenant du SDS. (D) Cette bandelette est placée au-dessus du gel qui constitue la seconde dimension et les protéines, soumises à un champ électrique, sont séparées selon leur MM. La détection des protéines se fait alors par coloration. Les images de gel obtenues sont quantitativement analysées par des logiciels spécialisés afin de sélectionner les spots d'intérêt. (E) Ces spots d'intérêt sont excisés et (F) les protéines digérées par une enzyme. Les peptides générés sont alors analysés par spectrométrie de masse afin d'obtenir une identification des protéines initialement présentes. Illustration adaptée de Rabilloud and Lelong, 2011.

2.2. Visualisation des protéines pour leur quantification « en gel »

2.2.1. Révélation des protéines par coloration post-électrophorétique

Afin de les visualiser, les protéines peuvent être colorées après électrophorèse. Les deux agents de coloration les plus couramment utilisés sont le bleu de Coomassie et le nitrate d'argent. Cependant, d'autres techniques plus coûteuses basées sur la fluorescence existent.

En solution acide, le **bleu de Coomassie** (colorant textile, G250 ou R250 principalement) s'adsorbe sur les acides aminés basiques et aromatiques des protéines *via* des interactions électrostatiques et hydrophobes (Fazekas de St Groth *et al.*, 1963). La coloration au bleu de Coomassie a une sensibilité modérée (ordre du ng) pour une linéarité et une homogénéité correcte. Elle est non covalente et est donc facilement réversible grâce à des techniques simples de décoloration. Les protéines étant intactes après décoloration, la coloration au bleu de Coomassie est compatible avec la spectrométrie de masse.

La coloration basée sur l'utilisation du **nitrate d'argent** consiste en la liaison de sels d'argent sur les protéines qui après réduction précipitent en argent métallique (Merril *et al.*, 1979). Cette coloration est quant à elle beaucoup plus sensible (ordre du ng au pg) mais possède une moins bonne linéarité, une moins bonne homogénéité et une compatibilité médiocre avec la spectrométrie de masse. En effet, les protéines sont modifiées de façon covalente rendant leur analyse en spectrométrie de masse incompatible. Il faut alors trouver un compromis entre le temps de réaction du nitrate d'argent sur les protéines (en surface du gel) et l'intensité de coloration afin de pouvoir réaliser une analyse par spectrométrie de masse sur les protéines restées intactes au cœur du gel. De plus, l'utilisation de formaldéhyde ou de glutaraldéhyde dans les solutions de coloration doit être limitée pour le premier et évitée pour le second dans ce type d'analyse en raison de la réticulation irréversible des protéines provoquée par ces agents. Ce type de coloration est également sensible à un certain nombre de paramètres, tels que la température et le temps de révélation, faisant de la coloration au bleu de Coomassie une coloration préférentielle pour une analyse protéomique.

Il est également possible de colorer les protéines à l'aide de colorants fluorophores chélateurs de métaux de la famille SYPRO (les plus connus étant le SYPRO Ruby (Steinberg *et al.*, 1996) et le RuBPS (Rabilloud *et al.*, 2001)). Ces colorations, basées sur la **fluorescence**, sont sensibles (ordre du ng au pg), douces, non covalentes et par conséquent compatibles avec la spectrométrie de masse. De plus, la quantification des MPTs (phosphorylation et glycosylation) est également envisageable grâce au marquage des protéines, toujours à l'aide de fluorophores, au niveau des sites de phosphorylation (ProQdiamond) ou de glycosylation (ProQemerald) (*Multiplexed Proteomics* (Steinberg *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2003).

Contrairement à la coloration basée sur la fluorescence, les colorations au nitrate d'argent et au bleu de Coomassie sont visibles à l'œil nu. Cependant, elles doivent être toutes

trois analysées informatiquement après numérisation des gels (par un densitomètre ou un scanner à fluorescence). L'une des contraintes de ces techniques de coloration reste la variabilité retrouvée entre les gels. Cette faible reproductibilité est provoquée par des migrations plus ou moins différentes dites gel-dépendantes. Dès lors, la dimension statistique d'une approche différentielle par gel nécessite de multiplier les images de gels pour assurer une comparaison informatique statistiquement fiable.

2.2.2. Révélation des protéines par coloration pré-électrophorétique

Le principe de la **2D-DIGE**, pour *Difference gel electrophoresis* (ou électrophorèse différentielle), est le même que celui de la 2D-PAGE, mis à part le marquage préalable des protéines (avant séparation électrophorétique) avec des sondes fluorescentes qui ne modifient pas le pI des protéines (Unlü *et al.*, 1997). Il existe un marquage dit « minimal » où les fluorophores utilisés (dérivés esters N-hydroxy succinimidyl de cyanine (Cy) 2, 3 et 5) vont se fixer par covalence sur les fonctions amine libres (extrémité N-terminale et groupement ϵ -amino des lysines). En utilisant un ratio protéine/fluorophore relativement élevé, un résidu lysine par protéine sera marqué (beaucoup de protéines restent cependant non marquées). Il existe également un marquage par « saturation » où les fluorophores (dérivés maléimides de Cy3 et Cy5) vont se fixer par covalence au niveau des groupements *thiols* des cystéines. L'ensemble des résidus cystéine est alors marqué. Le marquage par saturation est particulièrement adapté pour l'analyse des protéines minoritaires.

Les échantillons provenant d'états cellulaires différents (jusqu'à 3 états différents) sont marqués par un des fluorophores puis combinés (mélange équimolaire) avant d'être séparés en même temps sur un gel unique. Ainsi, le problème de variabilité entre les gels est éliminé et le nombre de gel à réaliser diminué. Il est également possible d'augmenter la précision de la méthode en utilisant le troisième fluorophore (souvent Cy2) pour le marquage d'un standard interne composé du mélange équimolaire des deux échantillons à comparer. Après séparation électrophorétique, l'intensité de fluorescence, provenant des trois états différents, est quantifiée par numérisation des gels à l'aide d'un scanner à fluorescence grâce aux différentes longueurs d'ondes d'excitation des fluorophores, puis les images des gels sont comparées informatiquement. Cette technique de visualisation des protéines possède une très bonne sensibilité (ordre du ng au pg), linéarité et compatibilité avec la spectrométrie de masse mais reste la plus coûteuse (Minden *et al.*, 2009).

2.3. Avantages et limites des analyses électrophorétiques

Les analyses 2D-PAGE et 2D-DIGE présentent plusieurs avantages. Elles permettent d'obtenir une image analytique finale, quantitative, reproductible et figée de l'hétérogénéité

protéique de l'échantillon d'intérêt. De plus, la diversité protéique issue des MPTs est conservée et peut être étudiée par diverses techniques dont la spectrométrie de masse.

La technique d'électrophorèse bidimensionnelle présente cependant des limites du fait des propriétés physico-chimiques particulières de certaines protéines, telles que les protéines de MM extrême (supérieure à 200 kDa et inférieure à 10 kDa), les protéines fortement hydrophobes (qui ont tendance à précipiter à leur pI), les protéines peu abondantes (gamme dynamique de détection de 10^3 à 10^4) ou encore les protéines de pI extrêmes (inférieur à 3 et supérieur à 11) (Braun *et al.*, 2007; Rabilloud, 2002). De plus, malgré les nombreuses optimisations techniques mises en œuvre lors d'analyses électrophorétiques, toutes les protéines d'un échantillon donné ne pourront être détectées engendrant des pertes d'informations. Seules les protéines révélées par coloration seront découpées et donc analysées par la suite. Pour finir, en raison d'une résolution des gels pas toujours suffisante, la quantification des protéines reste parfois ambiguë sachant qu'un spot peut contenir plus d'une protéine.

L'analyse en gel d'électrophorèse est limitée à l'étude des protéines les plus abondantes (Petrak *et al.*, 2008) et est difficilement adaptable à une stratégie d'analyse à haut débit.

3. Quantification des protéines *via* l'analyse des peptides par spectrométrie de masse

Une stratégie totalement différente de celle préalablement décrite sur protéines entières émerge de plus en plus : il s'agit d'une approche sur peptides, appelée **shotgun**. Les protéines d'un échantillon sont directement soumises à une digestion enzymatique. Les peptides résultant, de masse comprise entre 500 et 4000 Da, se retrouvent alors en mélange et sont séparés puis analysés par spectrométrie de masse. Dans le cas d'échantillons complexes, cette approche présente une limite non négligeable qui repose sur la multiplication de l'hétérogénéité de l'échantillon en raison de cette digestion enzymatique. Le fractionnement des protéines avant digestion et l'analyse de sous-protéome dans le cas de ces échantillons complexes peuvent alors s'avérer essentiels afin d'augmenter la sensibilité de l'analyse et ainsi obtenir un meilleur taux d'identification des protéines.

3.1. Séparation des protéines pour la simplification des échantillons

Les protéines peuvent être séparées par électrophorèse 1D-PAGE comme précédemment décrit ou par focalisation isoélectrique *Off-Gel* (Ros *et al.*, 2002). Cette dernière consiste à séparer les protéines en solution en fonction de leur pI *via* un système de puits. Une fois arrivées à leur pI, les protéines restent bloquées dans un puits. Ces techniques sont plus

particulièrement utilisées afin de fractionner l'échantillon sous forme de bandes (1D-PAGE) ou en solution dans des puits (*Off-Gel*) qui seront analysées en parallèle.

La chromatographie liquide (LC) est également utilisée pour la séparation des protéines. Cette technique de séparation est basée sur les différences d'affinités des protéines à l'égard d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. Plusieurs types de LC existent selon la phase stationnaire utilisée : la chromatographie d'exclusion stérique (séparation selon la taille), la chromatographie d'échange d'ions (séparation selon la charge), la chromatographie d'affinité ou encore la chromatographie en phase inverse (séparation selon l'hydrophobicité). L'élution des protéines se fait par collecte des éluats permettant ainsi de fractionner l'échantillon de départ. Ces techniques de chromatographie des protéines concernent essentiellement des échantillons peu complexes et sont assez sensibles aux détergents. Elles sont donc principalement utilisées pour l'enrichissement de protéines d'intérêt dont certaines propriétés biochimiques sont connues.

3.2. Séparation des peptides

3.2.1. Séparation des peptides par électrophorèse

L'utilisation de l'électrophorèse pour la séparation des peptides selon leur charge est principalement réalisée par les techniques d'IEF *Off-Gel* (Hörth *et al.*, 2006) et d'électrophorèse capillaire (EC) (migration en phase liquide). L'IEF des peptides issus de protéines en mélange est généralement réalisée dans un but de pré-fractionner l'échantillon (tout comme la chromatographie des protéines) pour en réduire son hétérogénéité. L'EC, encore peu utilisée il y a quelques années en protéomique, est en plein essor pour la séparation des peptides et même des protéines (analyse top-down) avant leur analyse en spectrométrie de masse (couplage EC-MS possible) (Desiderio *et al.*, 2010; Staub *et al.*, 2009). Bien qu'encore très peu utilisée contrairement à l'HPLC, l'électrophorèse capillaire est une technique offrant une meilleure sensibilité et résolution que cette dernière.

3.2.2. Séparation des peptides par HPLC

Dès 1965, la société Dupont de Nemours est en partie à l'origine du développement de l'HPLC. Actuellement, l'HPLC en phase inverse est la LC la plus couramment utilisée en protéomique. Bien qu'elle puisse être utilisée pour la séparation des protéines, son utilisation majeure concerne la séparation des peptides selon leur hydrophobicité. Plus précisément, les peptides sont séparés selon leur coefficient de partage entre une phase stationnaire hydrophobe composée de chaînes linéaires hydrocarbonées (18 chaînons carbonés dans le cas des peptides) et une phase mobile dont la polarité diminue par un gradient de concentration

croissante d'un solvant organique miscible à l'eau, tel que l'acétonitrile (ACN). D'autres modes de séparation ayant des sélectivités différentes sont envisageables : la chromatographie d'échange d'ions (les peptides sont séparés selon leur charge), la chromatographie d'exclusion stérique (les peptides sont séparés selon leur taille) ou encore la chromatographie d'interaction hydrophile (adaptée aux petites molécules polaires) ou hydrophobe (force ionique). Plusieurs facteurs peuvent permettre de jouer sur l'amélioration de la séparation des peptides : principalement les caractéristiques de la colonne elle-même (longueur, granulométrie, composition et miniaturisation) et le gradient d'élution (concentration en solvant, débit et durée). Les peptides élués pendant le *run* chromatographique sont alors directement analysés en spectrométrie de masse, de façon *on line* (c'est-à-dire par injection directe) dans le cas d'une source électrospray ou *off line* (c'est-à-dire avec dépôt sur cible) dans le cas d'une source MALDI.

Dès lors, « couplée » à la spectrométrie de masse, l'HPLC, qualifiée de pré-fractionnement MS, s'avère être un outil extrêmement efficace pour l'identification quasi-exhaustive de protéines en mélange complexe. Ainsi, l'HPLC permet de pallier les limites des techniques « en gel ». Cependant, contrairement aux approches par électrophorèse (Figure 12A), aucun support visuel ne vient illustrer l'hétérogénéité protéique d'un échantillon donné. Aucune information structurale sur les protéines n'est obtenue rendant ainsi les interprétations plus délicates. Néanmoins, les progrès informatiques actuels permettent d'obtenir une représentation bidimensionnelle des séparations. Celle-ci illustre la répartition des peptides totaux injectés dans la colonne selon leur temps d'élution et leur rapport de m/z (Figure 12B).

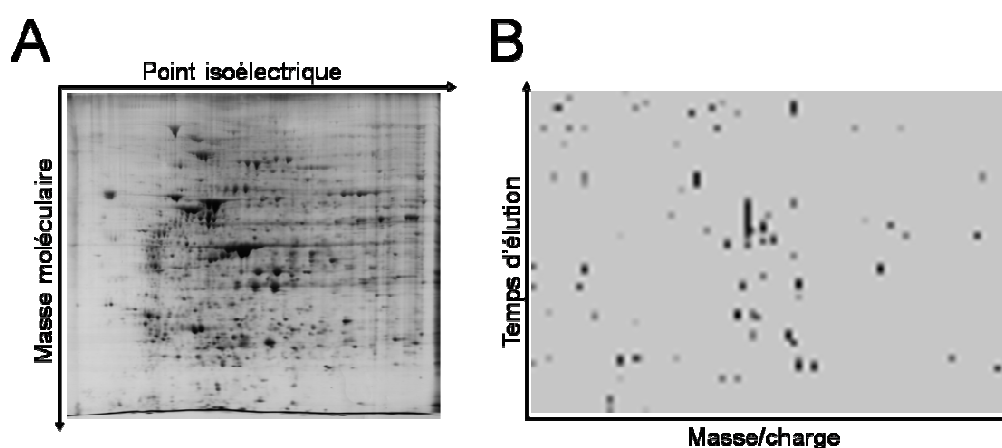


Figure 12 : 2D-PAGE vs HPLC.

(A) Image obtenue après numérisation d'un gel d'électrophorèse bidimensionnelle, coloré au nitrate d'argent, montrant la répartition des protéines, issues d'un extrait de BCECs, en fonction de leur pI et de leur MM. (B) Image agrandie obtenue après HPLC-MS montrant la répartition des peptides, issus d'un extrait protéique de BCECs, élués selon leur temps d'élution et leur rapport de masse/charge (données non publiées).

Pour les échantillons très complexes, il est possible de coupler deux (ou plusieurs) systèmes de chromatographie basées sur des sélectivités différentes tels que la chromatographie d'échanges de cations suivie d'une HPLC en phase inverse (Di Palma *et al.*, 2012; Motoyama and Yates, 2008). Cette technique, appelée **chromatographie multidimensionnelle**, offre deux dimensions de séparation et permet ainsi d'obtenir un haut taux d'identification protéique puisque la capacité de résolution (correspondant aux nombres de composés séparables) est égale au produit de la capacité de résolution des deux systèmes chromatographiques.

3.3. Quantification des protéines à partir des peptides

La quantification des protéines est envisageable grâce à la spectrométrie de masse. Deux grandes méthodes existent : une méthode dite *label free* car n'ayant besoin d'aucun marquage (Figure 13A) et à l'inverse une méthode basée sur le marquage préalable des protéines ou des peptides (Figure 13B).

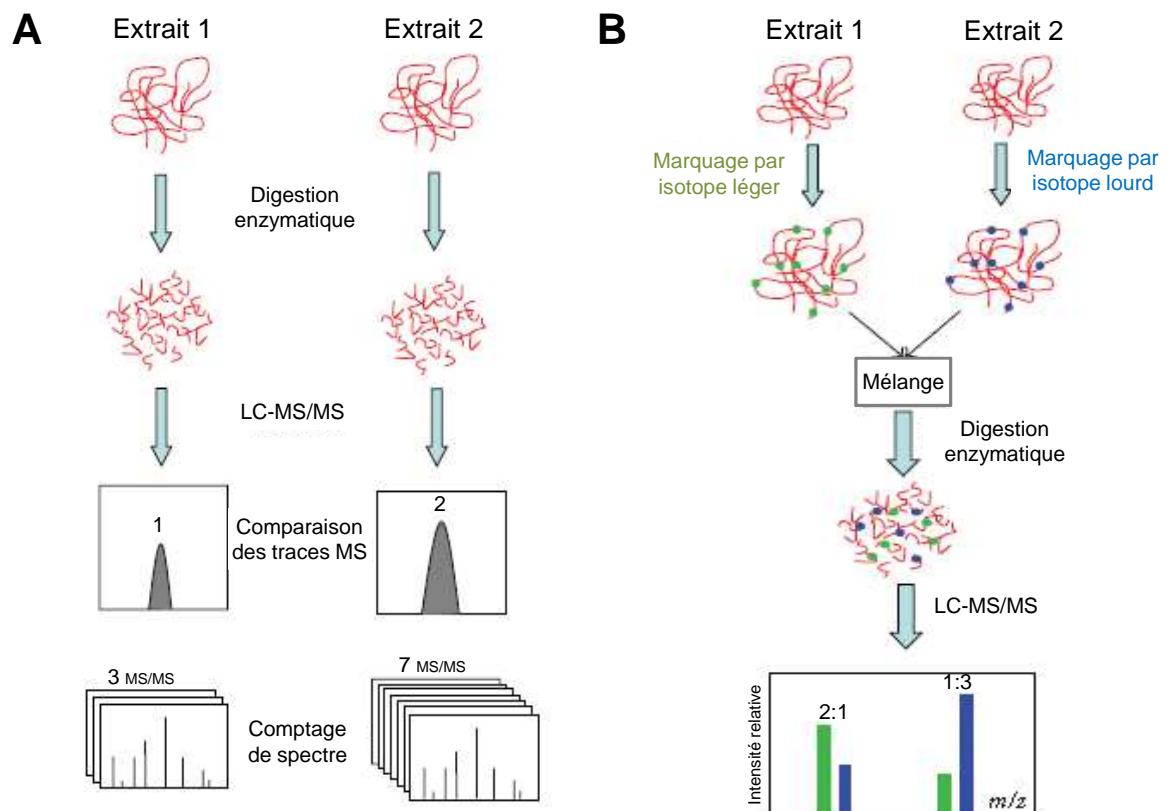


Figure 13 : Comparaison de la quantification *label free* (A) et de la quantification avec marquage par isotopes stables des protéines (B).

La quantification *label free* consiste à deux analyses effectuées en parallèle puis comparées. La quantification par marquage isotopique permet quant à elle une comparaison des signaux de masse, sur le même spectre de masse, des peptides isotopes. LC-MS/MS, chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Illustration adaptée de Zhu *et al.*, 2010.

Peu coûteuse car ne nécessitant pas de marquage préalable des protéines, la quantification *label free* est la technique la plus répandue mais est également la technique la moins exacte (Panchaud *et al.*, 2008). A l'origine, la spectrométrie de masse n'est pas un outil quantitatif. En effet, les peptides issus de la digestion enzymatique possèdent une large gamme de propriétés physico-chimiques (taille, charge, hydrophobicité, etc.) qui induisent une réponse en spectrométrie de masse propre à chaque peptide. Dès lors, pour obtenir une quantification précise, il est nécessaire de comparer chaque peptide individuellement entre chaque expérience. Les techniques de quantification par spectrométrie de masse, basées sur le marquage isotopique des peptides, bien que très coûteuses, sont parfaitement adaptées pour pallier ce problème de quantification. En effet, un peptide marqué par un isotope stable sera chimiquement identique au peptide natif ce qui permettra d'obtenir le même profil, à la fois pendant la chromatographie mais également en spectrométrie de masse (visualisation des profils isotopiques sur le même spectre de masse). Presque toutes les méthodes de quantification sont relatives (détermination de l'abondance relative d'une protéine à partir des ratios d'intensité des ions des paires de peptides correspondant). La quantification absolue des protéines est possible mais reste pour le moment, de par sa difficulté de précision, une approche ciblée.

3.3.1. Quantification relative

3.3.1.1. Quantification sans marquage préalable

Dans l'optique d'une analyse protéomique différentielle quantitative, trois points sont importants : la rapidité, l'efficacité et la reproductibilité des analyses. La quantification *label free* est encore très utilisée actuellement pour sa rapidité, son faible coût et sa simplicité d'utilisation. Il existe deux grandes méthodes de quantification dites *label free*. La première consiste en la comparaison des spectres MS, où le changement d'intensité de signal d'un peptide en spectrométrie de masse (notamment l'aire ou la hauteur du pic) est corrélé avec la quantité de protéine. La seconde consiste en un comptage de spectres MS/MS, où le nombre de peptides séquencés d'une même protéine est corrélé à sa quantité. La quantification *label free* implique que les échantillons à comparer soient préparés séparément et analysés individuellement par LC-MS/MS. Les changements en termes d'abondance de protéines sont calculés après comparaison des différentes analyses. La quantification absolue des protéines est possible en *label free* via l'utilisation de standards internes.

3.3.1.1.1. Comparaison des spectres MS

En 1999, Voyksner (Voyksner and Lee, 1999) démontre que l'intensité du signal d'un peptide détecté en MS peut être corrélée avec la quantité de l'espèce correspondante lors

d'une ionisation par électrospray. Ainsi, en se basant sur cette corrélation, l'intensité de signal des peptides d'une expérience peut être comparée à l'intensité de signal des mêmes peptides correspondants provenant d'une ou plusieurs autres expériences, permettant d'obtenir une information de quantification relative (Bondarenko *et al.*, 2002). Le principal désavantage de cette technique réside dans les différences d'intensité (enregistrées pour un même peptide) causées par les variations expérimentales. Une excellente reproductibilité et une normalisation (standard interne ou facteur de normalisation) sont alors nécessaires afin d'identifier facilement les peptides identiques entre différentes expériences. Il existe pour ce faire des logiciels d'alignement de *run* LC, qui utilisent les temps de rétention et les signaux de m/z , permettant d'identifier les peptides apparentés. Ces logiciels permettent une automatisation des analyses des données, analyses impossibles à réaliser manuellement au vue des quantités importantes de données générées par ce type d'approche. Les intensités des pics (intensité des ions chromatographiques / intensité des ions peptidiques) sont calculées (aire ou hauteur) puis comparées entre les différentes séparations chromatographiques.

Bien que minimisée avec l'utilisation de spectromètres de masse à haute résolution, la présence de signaux de masse très proches pouvant interférer, peut parfois générer des erreurs de quantification. Dès lors, des réplicats techniques sont indispensables pour interpréter correctement les résultats.

Il y a cependant un compromis à trouver entre la robustesse de quantification et le nombre de protéines identifiées. Il est ainsi possible d'essayer dans un premier temps d'identifier le maximum de protéines *via* la fragmentation (mode MS/MS) puis dans une seconde analyse de s'attarder sur l'analyse MS simple afin d'optimiser le signal peptidique (pics résolus) en vue de la quantification.

3.3.1.1.2. Comptage de spectres (*spectral counting*)

Une protéine très abondante va générer, après digestion enzymatique, un nombre de peptides important. La technique de quantification *label free* par comptage de spectres s'appuie sur ce fait (Liu *et al.*, 2004). Dans cette technique, la quantification relative des protéines est basée sur la comparaison du nombre de spectres MS/MS identifiés pour une protéine entre plusieurs expériences. L'abondance d'une protéine est ainsi corrélée au nombre de spectres MS/MS (nombre de fragment) qui ont permis de l'identifier. Si par exemple dans une condition donnée, 8 spectres MS/MS sont enregistrés pour une protéine tandis que 12 spectres MS/MS sont enregistrés pour la seconde condition, on obtient un ratio de 1,5 entre les deux conditions. Dans cette approche, c'est le mode MS/MS qui apporte les informations, à la fois pour l'identification mais également pour la quantification des protéines.

Cette technique est cependant assez controversée car elle ne tient pas compte des propriétés physiques des peptides et suppose que la réponse en masse est linéaire et identique pour chaque protéine. Or, la réponse en termes de comptage de spectres va être différente pour chaque peptide car les temps de rétention et la largeur des pics chromatographiques sont différents. Dès lors, la normalisation, notamment concernant la taille des protéines (les longues protéines génèrent plus de peptides que les petites protéines) et l'analyse statistique des données obtenues seront très importantes pour la fiabilité de la quantification. Cette technique de quantification reste cependant très largement utilisée car les processus de traitement de données sont généralement les mêmes qu'une analyse classique d'identification de protéines.

L'abondance relative d'une protéine peut ainsi être rapportée à plusieurs indices comme l'indice d'abondance protéique (*protein abundance index*, **PAI**) défini par Rappsilber en 2002 (Rappsilber *et al.*, 2002) et qui correspond au nombre de peptides observés (dans la gamme de masse du spectromètre de masse employé) divisé par le nombre de peptides observables. Cet indice a ensuite été transformé en indice **emPAI** ($10^{\text{PAI}} - 1$) (Ishihama *et al.*, 2005b) et correspond à une transformation mathématique de l'indice PAI. L'outil **APEX**, pour *absolute protein expression*, inclut en plus dans le calcul un facteur de correction prédit (probabilité de détection des peptides selon leur propriétés physico-chimiques et selon le type de spectromètre de masse utilisé) pour chaque protéine (Braisted *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2007b).

3.3.1.2. Quantification par marquage *via* des isotopes stables

Les techniques de marquage par des isotopes stables des protéines ont été introduites en 1999 (Gygi *et al.*, 1999; Oda *et al.*, 1999; Paša-Tolić *et al.*, 1999). Le principe de ces méthodes de différenciation isotopique repose sur le marquage distinctif d'une condition par rapport à une autre, au niveau protéique ou peptidique, puis à la combinaison de ces différentes conditions. Deux peptides marqués par des isotopes différents (« couple de peptides »), de mêmes propriétés physico-chimiques, subiront ainsi la même ionisation et seront détectés sur le même spectre de masse avec un décalage (*shift*) de masse dépendant de l'isotope. La quantification se fait alors à l'aide de la spectrométrie de masse au niveau des modes MS ou MS/MS. Elle repose uniquement sur la recherche et la comparaison quantitative (aire ou hauteur), dans une même fraction chromatographique, des signaux de masse du couple de peptides. Un ratio est alors calculé pour établir la quantité relative de chacun des peptides du couple. Les signaux de masse se trouvant sur le même spectre de masse, ceux-ci n'ont pas besoin d'être normalisés comme pour les techniques sans marquage. Ces marquages, aisément détectables en spectrométrie de masse, référencés pour la plupart dans les banques de données, sont de trois ordres : (i) par marquage *in vitro* pendant la culture cellulaire par l'ajout d'atomes constitutifs ou d'acides aminés marqués au milieu de culture, (ii) par marquage des protéines après leur extraction cellulaire ou (iii) par marquage des peptides issus de la

digestion enzymatique des échantillons protéiques avant leur analyse. Le marqueur peut ainsi être introduit métaboliquement (1^{er} cas), chimiquement (2^e et 3^e cas) ou enzymatiquement (3^e cas).

Plusieurs isotopes peuvent être utilisés : l'isotope 13 du carbone (^{13}C), l'isotope 2 de l'hydrogène, (^2H ou D, deutérium) (qui peut cependant engendrer une élution différente en LC du couple de peptides les empêchant de se retrouver sur le même spectre de masse), l'isotope 18 de l'oxygène (^{18}O) ou l'isotope 15 de l'azote (^{15}N). On parle d'isotope léger (^{12}C , ^1H , ^{16}O , ^{14}N) et d'isotope lourd (^{13}C , ^2H , ^{18}O , ^{15}N).

3.3.1.2.1. Marquages métaboliques

3.3.1.2.1.1. Principe du marquage métabolique

Le marquage métabolique se fait pendant la synthèse protéique. Les cellules doivent être cultivées soit dans un milieu normal, non isotopique (« milieu léger »), ou alors dans un milieu exclusivement enrichi en isotope lourd (« milieu lourd »). La division cellulaire, la croissance cellulaire et tous les processus cellulaires conduisent à l'incorporation totale de l'isotope (100 %) dans les protéines des cellules cultivées en présence de ce dernier. Après culture, les cellules des deux conditions sont combinées et ainsi traitées de la même façon. Le marquage s'effectue très tôt dans le protocole expérimental et permet de réduire les biais expérimentaux. L'incorporation totale des marqueurs est un point crucial pour la quantification et doit être vérifiée à l'aide des spectres MS. Elle est considérée comme totale lorsque plus aucun peptide léger n'est observé pour la condition « milieu lourd ». Plusieurs divisions cellulaires sont ainsi nécessaires selon la nature des cellules utilisées. La quantité relative des protéines est alors déterminée par le ratio de l'intensité des pics de la paire de peptides en MS simple. L'identification se fait grâce à la fragmentation (MS/MS) des peptides.

Cette technique est idéale pour les lignées cellulaires, notamment les lignées immortalisées permettant plusieurs passages (repiquage des cellules). Elle reste néanmoins une technique longue et coûteuse. Deux grands types de marquage métabolique existent : le marquage ^{15}N ou ^{13}C et le marquage par ajout d'acides aminés isotopes au milieu de culture. Il est à noter que les MPTs restent observables par les méthodes classiques.

3.3.1.2.1.2. Enrichissement ^{15}N et ^{13}C

Les milieux de culture des cellules sont supplémentés ou non avec un marqueur isotopique ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ou $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) (Oda *et al.*, 1999). Après plusieurs cycles d'incorporation, les cellules renferment des protéines dont tous les acides aminés sont marqués (néo synthèse). L'inconvénient de cette technique réside dans le fait que la différence de masse entre un

peptide marqué ou non va dépendre de sa séquence en acide aminé (nombre d'azote ou de carbone) compliquant l'analyse des données.

3.3.1.2.1.3. SILAC : *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*

Introduite en 2002, cette technique consiste à substituer un ou deux acides aminés du milieu de culture par leurs homologues isotopiques (Ong, 2002). L'acide aminé isotope doit de préférence être un acide aminé essentiel ou être présent dans le milieu de culture en concentration importante pour éviter qu'il ne soit fabriqué par la cellule, et doit être retrouvé dans le plus grand nombre de peptides possibles. Cette technique n'est donc pas utilisable chez les végétaux autotrophes. De plus, l'acide aminé ne doit pas être métabolisé en un autre acide aminé par la cellule car cela engendrerait un marquage complémentaire, compliquant les analyses de données. Par exemple, l'arginine se convertit en proline dans certaines lignées cellulaires. On peut néanmoins ajouter de la proline en excès afin d'éviter sa conversion (Bendall 2008). La leucine et la lysine mais aussi la tyrosine et l'arginine (non essentiels mais nécessaires pour la survie des cellules) sont les acides aminés les plus couramment utilisés pour ce type de marquage (Ong *et al.*, 2003). Des doubles marquages (par exemple Arg/Lys ($^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$ -arginine / $^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$ -lysine)) sont aussi envisageables afin d'assurer un marquage de tous les peptides si la trypsine (coupure côté C-terminal de la lysine et de l'arginine) est l'enzyme de digestion utilisée (sauf pour le dernier peptide se situant côté C-terminal de la protéine). Les peptides ayant échappé au clivage auront un double marquage. Jusqu'à cinq états cellulaires différents ont été comparés (Molina *et al.*, 2010).

La technique **CDITs** pour *culture-derived isotope tags*, dérive de la technique SILAC (Ishihama *et al.*, 2005a). Dans cette étude, un standard interne est généré afin de quantifier le protéome d'un tissu (ici le cerveau de souris). Ce standard consiste en des cellules ayant pour origine le tissu à analyser (ici des cellules de neuroblastomes de souris) cultivées en milieu lourd selon la technique SILAC. Ces cellules cultivées sont mélangées à deux échantillons de tissus (cérébraux) différents. Pour chaque échantillon, un ratio est obtenu en MS entre les peptides issus du tissu à analyser et les peptides isotopes issus des cellules cultivées. Le changement de la quantité de protéines entre les deux tissus est estimé en calculant le ratio des deux ratios obtenus précédemment. Les protéines présentes dans le tissu mais pas dans les cellules cultivées peuvent également être quantifiées. Le ratio du peptide (non retrouvé dans les cellules cultivées) est obtenu en calculant le ratio entre ce peptide et un autre peptide, issu des cellules cultivées, de séquence différente mais de même temps de rétention.

La technique **super-SILAC**, récemment introduite (Deeb *et al.*, 2012; Geiger *et al.*, 2010), consiste en l'utilisation comme standard interne d'un mélange de lysats de plusieurs lignées cellulaires marquées *via* la technique SILAC. Cette dernière est utilisée dans le but de caractériser et comparer plusieurs lignées cellulaires et notamment les tumeurs.

La technologie SILAC trouve aussi des applications en expérimentation *in vivo* et a été nommée **SILAM**, pour *stable isotope labeling of mammal*. Partant du fait qu'*in vitro* il n'est pas possible d'obtenir un état physiologique identique à l'*in vivo*, des rats ont été métaboliquement marqués avec des isotopes stables (nourriture exclusivement constituée de protéines enrichies en isotopes). Ainsi, « toutes » les cellules de ces rats devraient être constituées de protéines marquées. Les auteurs ont montré que ces animaux marqués sont normaux et en bonne santé (Mcclatchy *et al.*, 2010). Leur obtention est cependant assez longue (plusieurs générations) et coûteuse.

3.3.1.2.2. Marquages chimiques et enzymatiques

Les marquages chimiques et enzymatiques interviennent plus tard dans la préparation des échantillons que les marquages métaboliques. Ces types de marquage ne sont alors plus limités à la culture cellulaire mais sont applicables à tous types d'échantillons. Le marquage peut s'effectuer au niveau d'un groupement fonctionnel d'un acide aminé spécifique des protéines ou des peptides (thiol des résidus cystéine, ϵ -amino des résidus lysine le plus souvent) ou spécifiquement au niveau des extrémités N-terminale ou C-terminale des peptides, de façon chimique ou enzymatique. Il est nécessaire de garder à l'esprit que la variation du ratio peut s'expliquer par la présence d'isoformes. Par exemple, les histones possèdent des modifications sur leur lysine et leur extrémité N-terminale pouvant affecter le marquage (Sarioglu *et al.*, 2006). Dans ce cas, le ratio n'indique pas une différence de quantité mais la présence de MPTs. De plus, les marquages chimiques peuvent engendrer des réactions secondaires donnant des produits inattendus et influençant les résultats de quantification.

3.3.1.2.2.1. Marquage des groupements thiols des cystéines

3.3.1.2.2.1.1. ICAT : *isotope-coded affinity tags*

Développé par Aebersold, ce marquage a été amélioré au fil des années. Le marquage s'effectue au niveau protéique sur le groupement thiol des cystéines grâce à un groupement iodo-acétamide conjugué par un bras espaceur à une biotine. La différence de masse va être induite au niveau du bras espaceur constitué d'atomes d'hydrogènes deutériés ou non ($\Delta Da = 8$ Da) ou d'atomes de carbone ^{12}C ou ^{13}C afin de prévenir les problèmes de temps d'élution différents entre 2H et D. Le marquage se fait généralement sur des protéines mais peut se faire également sur des peptides. Les deux conditions à comparer sont combinées après marquage et avant digestion enzymatique. Les peptides modifiés sont isolés par une colonne d'affinité (avidine-biotine) puis quantifiés par LC-MS/MS. Seuls les peptides possédant une cystéine sont isolés ce qui simplifie les échantillons mais diminue la couverture de séquence des protéines (en raison du faible pourcentage de cystéines présentes dans les protéines) et limite l'étude des

MPTs. Un excès de marqueur ou encore la présence de biotine endogène diminuent l'efficacité de la colonne et ainsi apportent un frein à l'utilisation de la colonne d'affinité avidine-biotine (Gygi *et al.*, 1999).

La biotine, qui engendre une diminution de l'énergie de collision pendant la fragmentation, peut être éliminée avant la MS grâce à une liaison acide clivable. La technique **ALICE**, pour *acid-labile isotope-coded extractants*, dont le marqueur est constitué d'un groupement pour la fixation aux thiols, d'un bras espaceur acide labile et d'un polymère non biologique, est une technique dérivée de l'ICAT qui permet d'éliminer la biotine et ainsi d'augmenter l'efficacité de la fragmentation en mode MS/MS (Qiu *et al.*, 2002). Dans le même esprit, une version photo-clivable a été développée (Bottari *et al.*, 2004).

3.3.1.2.2.1.2. Autres méthodes

Des auteurs proposent un marquage *via* de petites molécules organiques comme le **N-ethymaleimide** ($^1\text{H}_5\text{-NEM}$ / $^2\text{H}_5\text{-NEM}$, $\Delta = 5$ Da) ou l'**iodoacétamide** ($^{12}\text{C}_6\text{-IAA}$ / $^{13}\text{C}_6\text{-IAA}$, $\Delta = 6$ Da) (Kurono *et al.*, 2006). Ces petites molécules réagissent avec le groupement thiol des cystéines. Il existe également une technique permettant d'alkyler les cystéines avec de l'acrylamide ou du vinylpyridine deutérié ou non ($^1\text{H}_3/^2\text{H}_3\text{-acrylamide}$ ou $^1\text{H}_4/^2\text{H}_4\text{-vinylpyridine}$) (Gehanne *et al.*, 2002; Sechi, 2002). L'utilisation de petites molécules présente l'avantage d'améliorer la solubilité des protéines et d'accéder plus aisément aux sites de marquage.

Après combinaison des échantillons des deux conditions, les protéines sont généralement séparées par 2D-PAGE, ce qui élimine le problème de décalage du temps de rétention en HPLC dû au deutérium, puis analysées en MS par ionisation douce afin d'éviter le problème de fragmentation du marqueur parfois rencontré avec la technique ICAT. Ainsi, on retrouve certains avantages de la 2D-DIGE (échantillons sur le même gel) mais les inconvénients classiques d'une analyse « en gel ». La quantification se fait ici par spectrométrie de masse et non par la visualisation d'intensité des spots. La 2D-PAGE est utilisée ici pour l'identification des protéines par PMF en s'affranchissant d'une analyse MS/MS. Ceci permet de simplifier les analyses et d'éviter une nouvelle fois le problème de fragmentation du marqueur rencontré avec la technique ICAT.

3.3.1.2.2.2. Marquage des groupements amine

Les protéines peuvent être marquées de façon covalente sur leurs fonctions amine libres (extrémité N-terminale et ϵ -amino des lysines), la lysine étant un acide aminé bien mieux représenté au sein des protéines que la cystéine. Cependant, le marquage des protéines sur les lysines (mais également sur les cystéines) présente le désavantage de n'être que partiel sur des protéines entières engendrant des pertes d'informations au niveau peptidique. Il est alors

possible de marquer directement les peptides au niveau de leur extrémité N-terminale (et également C-terminale) afin d'obtenir un marquage universel de ces derniers, indépendamment de leur composition en acides aminés ou des MPTs.

3.3.1.2.2.1. ICPL : *isotope-coded protein label*

Apparue en 2005 (Schmidt *et al.*, 2005), l'approche ICPL consiste à marquer les groupements amine libres des protéines. Les molécules traceuses sont des **N-nicotinoyloxy-succinimide** ($^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$) dont la différence de masse ($\Delta\text{Da} = 6,02 \text{ Da}$) est aisément observable en spectrométrie de masse. La quantification est réalisée en mode MS par comparaison de l'intensité des pics. L'identification des protéines se fait quant à elle en mode MS/MS. Ces dernières années, une approche triplex et quadruplex utilisant une combinaison des isotopes du carbone et de l'hydrogène ($^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$, $^1\text{H}_4/^2\text{H}_4$, $^{13}\text{C}_6/^{14}\text{C}_6$, $^{13}\text{C}_6/^{15}\text{C}_6$) pour la comparaison simultanée de trois ou quatre échantillons, a également été développée (Lottspeich and Kellermann, 2010).

Cette approche offre la possibilité de réduire la complexité du protéome, même après marquage, et de détecter les isoformes, les MPTs ainsi que les variants d'épissage (*via* la 2D-PAGE). Le marqueur, par sa faible masse et son hydrophilie, préserve les propriétés physico-chimiques des protéines et notamment leur propriété de précipitation dans les solutions aqueuses. De plus, le dérivé nicotinique joue un rôle d'amplificateur d'ionisation (augmentation du signal MS) et de fragmentation (amélioration des spectres de fragmentation) en masse.

Le marquage au niveau des lysines empêche la coupure tryptique au niveau de cet acide aminé. Elle se fera uniquement au niveau des arginines, générant ainsi des peptides plus grands et donc plus difficiles à fragmenter. Afin de pallier ce problème, il est possible de réaliser une double digestion enzymatique comme le couplage trypsine / endoprotéinase Glu-C dans le but d'obtenir des peptides plus petits.

Préalablement développé pour le marquage de protéines comme son nom l'indique, le marquage ICPL est également envisageable au niveau peptidique et est ainsi appelé *post-digest* ICPL (Leroy *et al.*, 2010). Cette technique permet de diminuer le pourcentage de protéines identifiées non quantifiées de 30 % pour une analyse classique à 2 % pour une analyse *post-digest* ICPL.

3.3.1.2.2.2. Marquage isobarique

Le marquage **iTRAQ** pour *isobaric tags for relative and absolute quantification* est basé sur le marquage covalent des groupements amine des peptides (Ross *et al.*, 2004). Développé pour le marquage de ces derniers, ce marquage est moins couramment utilisé au niveau

protéique (Wiese *et al.*, 2007). Le marqueur est composé d'un groupement chimique rapporteur de quantification (*reporter*), d'un groupement balance et d'un groupement réactif qui réagit avec les amines primaires. Actuellement, il est possible d'utiliser la technologie iTRAQ pour comparer 2, 4 ou 8 échantillons à la fois. Les groupements *reporter* se différencient par leur masse (113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121 Da), selon les combinaisons $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ et $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$. Les groupements balance ont une masse allant de 28 à 31 Da pour la comparaison de 4 échantillons ou de 184 à 192 Da pour la comparaison de 8 échantillons, afin d'équilibrer la masse totale constante des marqueurs (*reporter*-balance-réactif) à 145 Da ou 305 Da respectivement. Ainsi, la structure de chaque marqueur est identique. Dès lors, la différence de masse (introduite via les isotopes au niveau du groupement *reporter*) est compensée au niveau du groupement balance. Au final, les marqueurs présentent des propriétés physico-chimiques identiques en chromatographie et en spectrométrie de masse (MS simple) excepté en mode MS/MS. L'identification et la quantification des peptides nécessitent ainsi une étape de fragmentation en mode MS/MS. Les ions fragments des groupements *reporter* sont détectés avec des masses distinctes de 114 à 117 Da (4 échantillons) ou 113 à 121 Da (8 échantillons). Leur intensité en mode MS/MS est utilisée pour la quantification.

Le marquage **TMT** pour *tandem mass tags* est basé sur le même principe que le marquage iTRAQ mais diffère par des groupements *reporter* et des groupements balance différents. La masse des groupements *reporter* s'étend de 126 à 131 Da, celle des groupements balance de 99 à 104 Da pour une masse constante de 230 Da. Deux ou six réactifs TMT ont été développés et permettent la comparaison de 2 ou 6 échantillons simultanément. Le marquage au niveau des cystéines est également possible (Thompson *et al.*, 2003).

3.3.1.2.2.3. Autres méthodes

Les peptides peuvent être **diméthylés** sur leurs fonctions amines libres à l'aide de formaldéhyde (CH_2O) et de son homologue deutérié (CD_2O) (Hsu *et al.*, 2006). L'enzyme de digestion utilisée est l'endoprotéinase Lys-C afin d'obtenir au moins deux sites marqués par peptide (un sur la lysine en C-terminal et un sur l'extrémité N-terminale du peptide) ($\Delta\text{Da} = 4$ Da). Les peptides ayant une proline en position N-terminale sont uniquement monométhylés. Ce marquage est très rapide, peu coûteux, spécifique et permet l'obtention d'une réaction complète (proche de 100 %).

Cette technique a été appliquée pour l'utilisation de 4 marquages différents grâce au formaldéhyde ($\text{CH}_2\text{O}/\text{CD}_2\text{O}$) et l'utilisation d'isotopes d'agents réducteurs deutériés ou non (sodium cyanoborohydrure, NaBCNH_3 et sodium cyanoborodeutériure, NaBCND_3) nécessaires à la réaction. Les réactifs isotopiques sont ainsi combinés de la sorte : $\text{CH}_2\text{O} / \text{NaBCNH}_3$, $\text{CH}_2\text{O} / \text{NaBCND}_3$, $\text{CD}_2\text{O} / \text{NaBCNH}_3$ et $\text{CD}_2\text{O} / \text{NaBCND}_3$ ($\Delta\text{Da} = 4, 8$ ou 12 Da) (Hsu *et al.*, 2006).

Cependant, cette technique, appelée **multiplexe diméthylation**, augmente la complexité des analyses.

Il est possible de dériver des peptides *via* plusieurs autres méthodes qui ont plus ou moins montré leur efficacité. Toutes les techniques de dérivation des peptides par acylation des fonctions amines libres *via* des isotopes stables constituent la technologie de standard interne global (**global internal standard technology**, (GIST)) permettant le marquage universel de tous les peptides. Plusieurs réactifs peuvent-être utilisés tels que l'anhydride acétique, l'anhydride succinique, le N-acetoxy-succinimide, le 1-nicotinoyloxy-succinimide, le propionate, l'anhydride propionique, le 4-triméthylammonium butyrate, l'isocyanate ou encore l'isothiocyanate (Chakraborty and Regnier, 2002; Riggs *et al.*, 2005). Le marquage s'effectue avec les réactifs possédant des isotopes stables de l'hydrogène ou du carbone. L'acylation peut cependant affecter l'état de charge des peptides et donc leur ionisation.

Afin de simplifier l'analyse, il est possible de marquer uniquement l'extrémité N-terminale des peptides en évitant le marquage des groupements ϵ -amino des lysines par une guanidination préalable de celles-ci.

3.3.1.2.2.3. Marquage en C-terminal

Le marquage universel des peptides est également envisageable en C-terminal.

3.3.1.2.2.3.1. Marquage ^{18}O

Pendant la protéolyse : marquage catalysé par enzyme

Ce type de marquage est qualifié de substitution d'oxygène médiée par enzyme (*enzyme mediated oxygen substitution*, EMOS) (Fenselau and Yao, 2009; Mirgorodskaya *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 2001). Réalisé tardivement dans la préparation des échantillons, il s'effectue pendant la digestion enzymatique sur les groupements carboxyliques C-terminaux des peptides générés, grâce à l'utilisation d'eau « légère » (H_2^{16}O) ou « lourde » (H_2^{18}O). La fonction carboxylique C-terminale se retrouve sous la forme $\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$ ou $\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$. Selon l'enzyme utilisée, les peptides auront une incorporation d'isotopes différente : deux atomes d'oxygène ($\Delta\text{Da} = 4 \text{ Da}$) ou un seul ($\Delta\text{Da} = 2 \text{ Da}$). Cependant, le marquage est rarement complet, les peptides incorporent alors le marqueur à différents taux, compliquant les analyses.

Le marquage peut se faire soit directement pendant la digestion enzymatique dans de l'eau lourde ou soit après digestion à l'aide d'une étape supplémentaire d'incubation dans de l'eau lourde (Staes *et al.*, 2004).

Le challenge de ce type de marquage réside dans l'optimisation des protocoles expérimentaux afin d'empêcher l'action protéolytique résiduelle créant des échanges $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

inversée. L'inhibition de l'activité enzymatique par acidification ou augmentation de la température peut supprimer cette activité résiduelle. Il est également possible d'utiliser de la trypsine immobilisée sur billes, lesquelles seront ensuite éliminées par centrifugation, afin de minimiser la quantité d'enzyme en solution (Sevinsky *et al.*, 2009).

Après la protéolyse : marquage catalysé par acide

Une technique de marquage à l'eau lourde a récemment été mise au point. Ce marquage n'a pas lieu pendant la digestion enzymatique mais juste après celle-ci (Haaf and Schlosser, 2012). Il se fait par catalyse acide *via* de l'acide chlorhydrique (HCL) en présence d'eau lourde, sur les groupements carboxyliques (extrémité C-terminale, glutamate, aspartate et cystéines carboxyméthylées) et non uniquement sur l'extrémité C-terminale. L'optimisation de ce marquage a permis d'obtenir une incorporation du marqueur de 95 à 97 %. *Via* cette technique, la plupart des peptides ont une différence de masse supérieure à 4 Da permettant de réduire les risques de recouvrement isotopique. L'action protéolytique résiduelle est ici complètement inhibée suite à l'incubation avec de l'HCL. Cette technique n'est pas applicable aux peptides portant des MPTs sensibles à un pH acide.

3.3.1.2.2.3.2. Marquage au méthanol

Le méthanol (CH_3OH) et le méthanol deutérié (CD_3OH), en présence d'HCL, sont utilisés pour estérifier les groupements carboxyliques C-terminaux des peptides, de l'aspartate et du glutamate (Goodlett *et al.*, 2001). Ce marquage est idéal pour la quantification des phosphopeptides car l'estérification permet de réduire l'affinité non souhaitée des peptides acides pour les colonnes de chromatographie d'affinité par métal immobilisé (IMAC) augmentant les rendements de fixation des peptides phosphorylés.

Cependant, la désamidation oxydative de l'asparagine et de la glutamine (en acide aspartique et acide glutamique, $\Delta\text{Da} = 1 \text{ Da}$) parfois provoquée par cette violente réaction constitue un désavantage qui complique l'analyse des données.

3.3.1.2.2.4. Marquage des MPTs

La diversité des MPTs augmente considérablement la complexité du protéome. L'étude et la quantification des protéines possédant des MPTs peuvent également être réalisées *via* des marquages isotopiques. Deux grandes stratégies sont généralement utilisées pour ce type d'étude.

La première stratégie consiste simplement en un marquage isotopique de tous les peptides (sur les amines primaires ou sur les groupements carboxyliques pendant la

protéolyse) puis à la sélection des peptides possédant la MPT à étudier pour leur analyse. Par exemple, les peptides phosphorylés (phosphate principalement sur les tyrosines, sérines et thréonines) sont isolés à l'aide d'une chromatographie d'affinité par métal immobilisé ou aux oxydes métalliques (IMAC ou MOAC) ou *via* des anticorps. De même, les peptides acétylés (sur les lysines) sont enrichis par immunoprécipitation par anticorps dirigés contre les sites acétylés. Quant aux glycopeptides, ils peuvent être isolés par chromatographie d'affinité *via* des lectines, par chromatographie d'interaction hydrophile ou encore à l'aide de billes magnétiques fonctionnalisées (Sparbier *et al.*, 2005). Cependant, il ne faut pas que le marqueur utilisé diminue l'efficacité de la technique de sélection (Riggs *et al.*, 2005). Dans ce cas de figure, il est possible de sélectionner dans un premier temps les protéines ou les peptides possédant la MPT puis dans un second temps de procéder au marquage.

La seconde stratégie consiste à cibler directement la MPT à étudier en la remplaçant par un groupement rapporteur (les résidus phosphosérine, phosphothréonine ou les sites de glycosylation). Brièvement, la modification (phosphates ou glycanes) est éliminée (β -élimination en conditions alcalines, hydrazinolyse, etc.) puis remplacée par un groupement chimique marqué (par exemple le 1,2-éthanedithiol ou son dérivé deutérié) (Weckwerth *et al.*, 2000). Le réactif utilisé pour la technique **PhIAT**, *phosphoprotein isotope-coded affinity tag* possède en plus une biotine afin de séparer facilement les peptides marqués (et donc initialement phosphorylés) des non marqués (non phosphorylés) à l'aide d'une colonne avidine (Goshe *et al.*, 2001).

3.3.2. Quantification absolue

La quantification absolue des protéines par dosage immunoenzymatique, tel que le dosage ELISA pour *Enzyme-linked immunosorbent assay*, a longtemps été la méthode de référence. Cependant, cette technique est une technique ciblée (quantification d'une protéine unique) pour laquelle la principale limite réside dans la disponibilité et le coût des anticorps. Dès lors, de nouvelles méthodes de quantification basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse ont vu le jour.

L'addition d'une protéine en quantité connue dans un échantillon peut permettre d'estimer l'abondance absolue de la quasi-totalité des protéines présentes dans l'échantillon lors d'approches *label free*. En effet, la concentration finale de la protéine supplémentée est corrélée à l'intensité des signaux de masse des peptides issus de sa digestion qui sera ainsi comparée à l'intensité des signaux de masse des peptides de l'échantillon. Cependant, cette technique conduit à un taux d'erreur non négligeable et l'interprétation des résultats doit être réalisée avec précaution.

Une deuxième technique de quantification absolue des protéines en spectrométrie de masse est basée sur l'utilisation d'un standard interne isotopiquement marqué. Elle concerne uniquement la quantification d'une ou quelques protéines d'intérêt et n'est donc pas adaptée à une analyse globale d'un protéome. En effet, elle est utilisée lorsque l'étude se base sur une ou plusieurs protéines connues, comme pour la validation de biomarqueurs en protéomique clinique.

Citons dans ce contexte la stratégie **AQUA**, pour *absolute quantification of proteins* (Gerber *et al.*, 2003), basée sur l'utilisation d'un peptide d'intérêt comme standard interne. Un peptide d'intérêt est un peptide, fréquemment observé en spectrométrie de masse, issu de la protéine à quantifier, sélectionné pour être synthétisé *de novo* avec un acide aminé portant un ou plusieurs atomes isotopiques. Des logiciels permettent de prédire ces peptides idéaux qui serviront de standard interne. Les propriétés physiques (taille, charge, hydrophobicité, ionisation) du peptide AQUA et du peptide natif restent les mêmes. La différence réside dans leur masse qui est par définition observable par spectrométrie de masse. L'échantillon biologique à analyser est alors supplémenté par une quantité connue du peptide AQUA avant digestion enzymatique et analyse par LC-MS. Un ratio est calculé en comparant le signal de spectrométrie de masse du peptide natif et du peptide AQUA. Il est également possible d'utiliser directement la protéine d'intérêt comme standard interne et de l'ajouter avant tout traitement de l'échantillon. Cette technique, dénommée **PSAQ**, pour *protein standard for absolute quantification* a été rapportée par une équipe française (Brun *et al.*, 2007). Bien que ces techniques permettent théoriquement l'étude des MPTs, la synthèse de peptides ou des protéines isotopiques servant de standard interne reste assez coûteuse.

Afin de permettre la quantification d'un groupe de protéines d'intérêt, une technique de construction de gènes synthétiques a été mise au point et dénommée **QconCAT** pour *quantification concatamer*. Après synthèse du gène, ce dernier est inséré dans un vecteur et exprimé dans une bactérie dans un milieu contenant des acides aminés isotopiquement marqués. Ce gène exprime alors une protéine chimère constituée des peptides standards concaténés permettant d'obtenir après digestion enzymatique du polypeptide plusieurs peptides isotopes d'une même ou de plusieurs protéines. Le polypeptide QconCAT est alors purifié puis ajouté comme standard interne à l'échantillon à analyser avant la digestion enzymatique (Beynon *et al.*, 2005).

Les techniques de quantification *selected reaction monitoring* et *multiple reaction monitoring* (respectivement **SRM** et **MRM**) permettent de pallier certains biais de la technique AQUA classique. L'analyseur du spectromètre de masse (triple quadripôle) contrôle à la fois la masse du peptide intact ainsi qu'un ion (SRM) ou plusieurs ions (MRM) fragments spécifiques du peptide. Dans le premier quadripôle, un peptide ionisé d'intérêt est isolé (par sa masse). Le deuxième quadripôle est une cellule de collision où le peptide est fragmenté. Le troisième

quadripôle sélectionne alors les fragments caractéristiques du peptide (Wolf-Yadlin *et al.*, 2007). La concentration du peptide cible est alors déterminée par comparaison des signaux observés du peptide cible soit à ceux du peptide isotopiquement marqué rajouté en quantité connue à l'échantillon soit à une courbe de calibration (gamme) en masse du peptide « pur » réalisée au préalable. Une fois les essais optimisés, la technique SRM ou MRM offre une sensibilité et une reproductibilité élevée (Addona *et al.*, 2009).

3.4. Avantages et limites de la quantification sur peptides

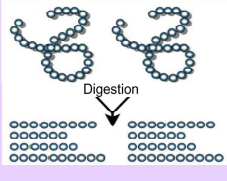
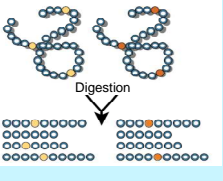
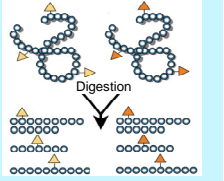
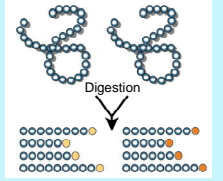
Quel que soit le type de spectromètre de masse employé, la protéomique différentielle, basée sur la comparaison de l'hétérogénéité protéique sans signe distinctif, dite *label free*, d'échantillons distincts, est assurément (i) la moins onéreuse et la plus économe en termes d'échantillon, (ii) la seule approche qui permet une comparaison de tous types et d'un nombre infini d'échantillons entre eux, (iii) bien adaptée à des échantillons moyennement complexes comme les sous-protéomes cellulaires, (iv) la plus exacte en termes d'identité de protéines, (v) mais également l'une des moins quantitatives et (vi) l'une des plus contraignantes en ce qui concerne la normalisation des séparations chromatographiques et de leur analyse par spectrométrie de masse (Tableau III) (Bantscheff *et al.*, 2007). Ainsi, comparée aux stratégies protéomiques basées sur le marquage isotopique stable des échantillons, l'approche *label free* représente, de par sa définition, le moins bon système de quantification relative d'échantillons entre eux. Cependant, contrairement aux analyses avec marquage isotopique, les spectres de masse sont moins complexes (on n'y retrouve pas simultanément les peptides marqués et non marqués) ce qui permet une analyse spectrale plus aisée et procure à cette technique une gamme dynamique plus élevée.

En ce qui concerne les marquages isotopiques, plusieurs inconvénients émergent à la lecture de différents travaux les utilisant. Les techniques permettant une quantification par MS, impliquent une limite minimale du *shift* de masse introduit par le marquage. Celui-ci doit être aisément détectable en MS afin de distinguer les massifs isotopiques du peptide marqué de celui du peptide non marqué. Il faut noter également que la résolution d'un massif isotopique diminue avec la masse du peptide, ce qui sous-entend que les marquages induisant un *shift* de masse faible ne seront pas adaptés à l'analyse des peptides de taille importante. De plus, des signaux de masse trop faibles (enfouis dans le bruit de fond) ou alors trop importants (saturation au niveau du détecteur) ne pourront pas permettre une quantification correcte. Cependant, l'évolution des spectromètres de masse et l'apport de la haute résolution permettent de plus en plus d'éviter ces pertes d'informations. La principale limite de l'utilisation des isotopes stables réside dans la possibilité de co-élution des peptides avec des molécules de même masse. La dé-complexification des échantillons est donc primordiale pour l'optimisation de ces analyses quantitatives.

Plus les étapes de marquage se feront tardivement dans la chaîne de l'analyse, plus une maîtrise et une rigueur dans la préparation des échantillons et le traitement bio-informatique et statistique de ces analyses seront essentielles, et ce d'autant plus pour les analyses sans marquage (Bantscheff *et al.*, 2007). Afin d'éviter les variations inter-échantillon dues aux biais expérimentaux et afin de contrôler la reproductibilité des analyses, le nombre d'étapes pour la préparation des échantillons doit être minimisé. D'autres biais techniques peuvent exister, notamment une incorporation incomplète de l'isotope ou encore le manque de pureté de celui-ci.

Cependant, bien que les spectromètres de masse soient de plus en plus performants, le nombre de protéines identifiées est limité au regard du nombre de protéines présentes dans l'échantillon ainsi qu'à la technique employée. En ce qui concerne le nombre de protéines quantifiées, celui-ci ne pourra être égal au nombre de protéines identifiées car toutes les protéines ne sont pas détectées dans chaque échantillon à comparer. Les taux d'identification et de quantification sont ainsi directement liés à la complexité de l'échantillon.

Tableau III : Avantages et limites des principales méthodes de quantification des protéines par spectrométrie de masse.

	Protéines			Peptides
	Label free (sans marquage) comptage de spectres / comparaison des traces MS	Marquage métabolique (pendant la culture cellulaire) ^{15}N et ^{13}C / SILAC	Marquage chimique (après extraction des protéines) -cystéine : ICAT / ALICE -amine : ICPL	Marquage des peptides: - iTRAQ / TMT (chimique sur amine) - ^{18}O / méthanol (enzymatique ou chimique sur C-ter et groupements carboxyliques)
				
	→ Deux analyses parallèles comparées	→ Une seule analyse (combinaison des échantillons après marquage), différence de masse correspondant au marqueur vue sur le même spectre de masse		
Précision	++	+++	++	++
Complexité de l'échantillon	++	++	+++	+
Nombre d'échantillons	+++	+	+	++
Faible Coût	+++	+	+	+++
Facilité d'analyse du signal	+	++	++	+++
Difficulté majeure	<ul style="list-style-type: none"> • Normalisation des séparations • Alignement des signaux 	<ul style="list-style-type: none"> • Limité aux cellules en culture • Temps 	<ul style="list-style-type: none"> • Recouvrement de séquence faible 	<ul style="list-style-type: none"> • Marquage tardif (combinaison tardive des échantillons)

L'encadré violet correspond à la quantification des protéines sans marquage et l'encadré bleu regroupe les méthodes de quantification des protéines basées sur un marquage isotopique. ALICE, *acid-labile isotope-coded extractants* ; ICAT, *isotope-coded affinity tags* ; ICPL, *isotope-coded protein label* ; iTRAQ, *isobaric tags for relative and absolute quantification* ; SILAC, *stable isotope labeling by amino acids in cell culture* ; TMT, *tandem mass tags*. Tableau adapté de Aebersold and Mann, 2003.

La dernière étape d'une analyse protéomique, non présentée ici mais cependant indispensable, concerne la vérification des résultats. Cette étape est d'autant plus importante que les données générées le sont. La fiabilité des résultats apportés est en effet reliée aux conclusions biologiques émanant de l'analyse. Elle peut faire l'objet d'analyses statistiques, être vérifiée manuellement (traitement des données) ou encore être validée par des analyses biochimiques complémentaires.

Étant donné les incessants développements (notamment des techniques de marquages isotopiques et de spectrométries de masse) et les différents challenges en protéomique, il est difficile de décrire de façon exhaustive, même succinctement toutes les techniques et les stratégies possibles pour la quantification des protéines. Ainsi, cette troisième partie de l'étude bibliographique a été focalisée sur les techniques les plus répandues tout en gardant à l'esprit que chacune de ces techniques est modulable et en recoupe souvent une autre (Figure 8). Chaque approche proposée ici, de par ses propres caractéristiques, ses limites et la diversité des propriétés physico-chimiques des protéines, ne peut qu'être complémentaire aux autres. Le choix d'une analyse « en gel » ou « hors gel » tout comme le choix du type de stratégie de quantification à utiliser va donc dépendre de la problématique de départ (Rabilloud, 2002).

Au vu de ces conclusions, notamment concernant leur complémentarité, et dans l'optique de comparer le protéome des BCECs solo-cultivées et co-cultivées, plusieurs de ces stratégies ont été réalisées au laboratoire. Pour les énumérer, nous avons utilisé l'approche « en gel » par 2D-PAGE et 2D-DIGE et l'approche « hors gel » par HPLC dont une étude sans quantification et une étude de quantification par marquage des protéines (ICPL). Ces deux dernières études font l'objet des travaux de thèse.

Conclusion de l'étude bibliographique

La BHE est une interface dynamique dont le rôle de filtre sélectif vise à maintenir et réguler le microenvironnement cérébral. Elle est ainsi une composante cruciale de l'UNGV. Bien qu'elle soit indispensable pour la protection du SNC, sa capacité à contrôler le passage des composés vers le parenchyme cérébral est un frein majeur en industrie pharmaceutique. L'étude des caractéristiques de la BHE a été très importante depuis sa découverte il y a maintenant plus de cent ans. Ces recherches ont mené à des progrès significatifs au niveau des connaissances de cette barrière. On comprend parfaitement que les principales recherches se sont focalisées sur les protéines membranaires : les jonctions serrées, les récepteurs et les transporteurs spécifiques, ceci dans un but de trouver un moyen efficace pour faciliter le passage de composés, tels que les médicaments, vers le cerveau.

Parmi les différents modèles de BHE, les études *in vitro* semblent plus appropriées pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'établissement et du maintien du phénotype BHE. Elles permettent également de limiter le nombre d'animaux sacrifiés. Cependant, les analyses *in vivo* restent indispensables dans le but de valider et vérifier les pistes que l'*in vitro* aura démarquées. La fiabilité des résultats expérimentaux obtenus est dépendante du modèle choisi. En utilisant le modèle expérimental développé au laboratoire du *Professeur Roméo CECHELLI*, le but de notre étude est d'**identifier les mécanismes protéiques du cytoplasme impliqués dans l'induction, par les cellules gliales, du phénotype BHE**, ceci à l'aide d'une stratégie protéomique. Deux conditions sont utilisées. La première consiste en une unique culture de BCECs bovines alors que la seconde se base sur la mise en culture de ces BCECs en présence de cellules gliales (comprenant environ 70 % d'astrocytes) extraites de rat nouveaux-nés. Cultivées seules, les BCECs perdent certaines de leurs propriétés de BHE alors que co-cultivées avec des cellules gliales, nous obtenons en 5 semaines, une grande quantité de BCECs au phénotype proche des CEs cérébrales *in vivo* (Dehouck *et al.*, 1990). Ainsi, **notre objectif est d'effectuer une analyse comparative du protéome cytoplasmique de BCECs solo-cultivées et co-cultivées.**

Deuxième partie
TRAVAUX PERSONNELS

**Deux stratégies protéomiques pour
l'analyse comparative des protéines
cytoplasmiques des cellules
endothéliales de la barrière
hémato-encéphalique**

Chapitre I

Introduction

Sommaire

- 1. Modèle biologique utilisé - 100 -
- 2. État du sujet dans le laboratoire au commencement de la thèse..... - 102 -

En contrôlant les échanges entre le sang et le cerveau, la BHE est garante de l'homéostasie cérébrale. Par cette propriété, elle est responsable d'un nombre élevé d'échecs d'essais thérapeutiques, en empêchant un grand nombre de médicaments d'atteindre leur cible cérébrale.

Bien que les propriétés physiologiques de la BHE soient relativement connues, les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'induction et du maintien du phénotype de BHE des BCECs restent pour beaucoup d'entre eux encore obscurs. En assurant la majeure partie des diverses fonctions cellulaires, les protéines sont les principales actrices du vivant et sont ainsi étroitement liées au phénotype des cellules.

L'objectif de ces travaux de thèse a donc été de mettre en évidence certaines protéines associées au phénotype BHE des BCECs. L'objectif indirect de ces travaux est de mieux comprendre le phénotype BHE afin de mettre en exergue de potentielles cibles thérapeutiques pour améliorer l'acheminement des médicaments vers le compartiment cérébral.

1. Modèle biologique utilisé

Nos travaux se sont portés sur le modèle *in vitro*, bien caractérisé, du laboratoire (Dehouck *et al.*, 1990). Les BCECs bovines (culture secondaire) sont mises en culture en présence ou en absence de cellules gliales de rat nouveaux nés (culture primaire) (Figure 14A). Cultivées seules, les CEs extraites de capillaires cérébraux perdent certaines de leurs caractéristiques *in vivo* liées au phénotype de BHE (BCECs possédant un phénotype BHE limité ou **Lim. BBB**) alors que leur culture en présence de cellules gliales permet une ré-induction des principales propriétés perdues (BCECs possédant un phénotype BHE ré-induit ou **Re-ind. BBB**). Les BCECs solo-cultivées présentent une diminution de la TEER (Boveri *et al.*, 2005), une perméabilité paracellulaire plus élevée vis-à-vis du jaune lucifer (LY), un traceur moléculaire fluorescent de petite taille (457,3 Da) connu pour traverser très peu la BHE (Figure 14B), une répartition plus diffuse de l'actine F au sein de la cellule, un marquage immunocytochimique beaucoup moins nette des protéines des jonctions serrées (claudine-5, occludine et ZO-1) (Figure 14C), une expression du transcrit de la P-gp deux fois moins importante (Figure 14D), une expression de la P-gp nettement diminuée et perdent l'activité de la γ -GT (Cecchelli *et al.*, 1999; Dehouck *et al.*, 1990). Les images issues de l'immunocytochimie de la vimentine (Figure 14C) renseignent quant à elles sur la forme des CEs, plus fusiformes, plus jointives et plus serrées et sur la densité et la régularité de la monocouche de CEs, plus homogènes en co-culture. Pour une même surface de culture, le nombre de CEs est environ 1,8 fois plus important en co-culture contrairement à la solo-culture.

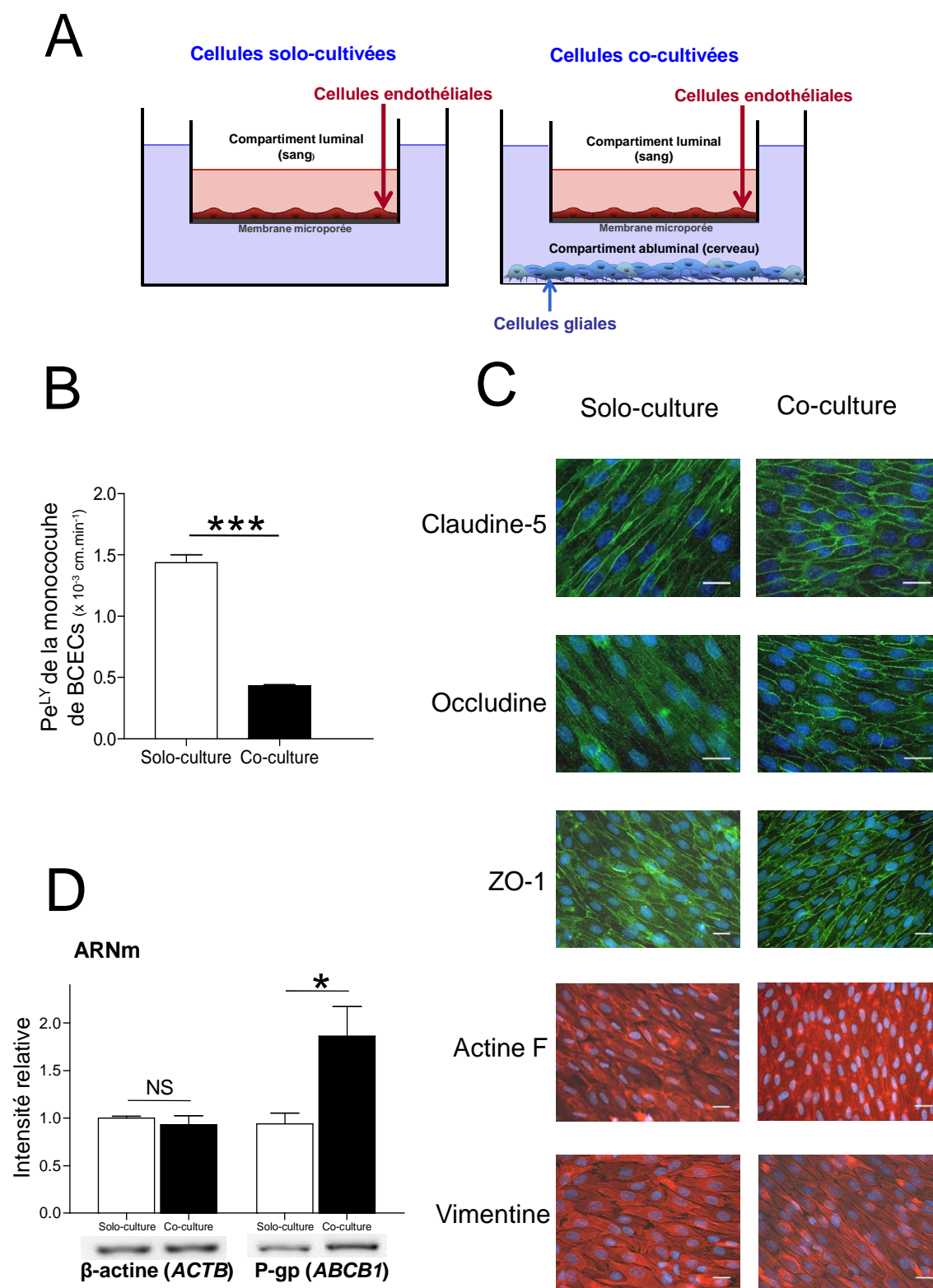


Figure 14 : Modèle de culture *in vitro* de BHE utilisé dans notre étude protéomique comparative.

Les CE sont soit cultivées seules (A gauche, solo-culture) ou en présence de cellules gliales cultivées en fond de puits (A droite, co-culture) (Dehouck *et al.*, 1990). La ré-induction des propriétés de BHE par les cellules gliales est visualisée par (B) mesure de la perméabilité de la monocouche de CE vis-à-vis d'un marqueur d'intégrité (le jaune lucifer, LY), (C) localisation par immunocytochimie des protéines de jonctions serrées ou associées (claudine-5, occludine et *zonula occludens*-1 (ZO-1)) ainsi que des protéines du cytosquelette (actine F et vimentine) et (D) transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR) de la P-glycoprotéine (P-gp) (pompe d'efflux) et de la β -actine (contrôle qualité).

2. État du sujet dans le laboratoire au commencement de la thèse

Les premières approches protéomiques comparatives des deux conditions cellulaires (solo-culture et co-culture) ont été réalisées par 2D-PAGE. Le spectromètre de masse utilisé au laboratoire pour l'identification des protéines est constitué d'une source MALDI associée à un analyseur TOF pouvant fonctionner en tandem (MALDI-TOF/TOF).

Étude 1 :

Actin, gelsolin and filamin-A are dynamic actors in the cytoskeleton remodelling contributing to the blood-brain barrier phenotype.

Pottiez G, Sevin E, Cecchelli R, Karamanos Y, Flahaut C. (2009), *Proteomics*, 9(5) : 1207-19.

Dans une première étude, les conditions de récupération des BCECs ont été optimisées en vue de leur analyse protéomique. En effet, la présence d'une matrice de collagène, indispensable à la croissance des BCECs et à la re-induction des propriétés de BHE, engendre une « contamination » des échantillons par des protéines sériques piégées au sein de cette matrice lors de la récupération des cellules. Afin de s'affranchir de ce biais, les BCECs doivent être en premier lieu dissociées de la matrice de collagène. Une méthode de récupération cellulaire enzymatique par la collagénase a ainsi été choisie pour éviter la protéolyse des protéines membranaires (comme avec la trypsine). L'analyse par 2D-PAGE des protéines solubles dans 1 % de Triton X-100 (extraction des protéines plutôt cytoplasmiques) a permis de dénombrier pas moins de 500 à 1000 spots protéiques révélés par coloration au bleu de Coomassie au sein d'un gel d'électrophorèse bidimensionnelle de pH 3-10 et de 100 à 10 kDa. Dès lors, l'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/TOF-MS) des 56 spots présentant une variation quantitative notable entre la condition solo-culture et la condition co-culture a conduit à l'identification de 20 protéines distinctes. Ces travaux ont ainsi révélé l'implication de protéines du cytosquelette, telles que l'actine F, la gelsoline et la filamine A dans l'acquisition du phénotype BHE.

Étude 2 :

A differential proteomic approach identifies structural and functional components that contribute to the differentiation of brain capillary endothelial cells.

Pottiez G, Duban-Deweer S, **Deracinois B**, Gosselet F, Camoin L, Hachani J, Couraud PO, Cecchelli R, Dehouck MP, Fenart L, Karamanos Y, Flahaut C. (2011), *Journal of Proteomics*, 75(2) : 628-41.

Lors de cette deuxième étude, les mêmes types d'échantillons ont été séparés par 2D-PAGE dans une gamme de pH plus réduite (pH 4-7, 100 à 10 kDa). L'analyse statistique des images des gels a permis de dénombrier 150 spots protéiques présentant une variation quantitative entre les deux conditions cellulaires. Au final, 81 d'entre eux, correspondant à 55 protéines distinctes, ont été identifiés par spectrométrie de masse. Ces protéines sont

principalement impliquées dans l'édification et l'ancrage à la membrane du réseau d'actine F mais également dans le métabolisme des protéines et les processus cellulaires de modification de ces dernières.

Étude 3 :

Glial-cell-mediated re-induction of the blood-brain barrier phenotype in brain capillary endothelial cells: a differential gel electrophoresis study.

Deracinois B, Pottiez G, Chafey P, Teerlink T, Camoin L, Broussard C, Couraud PO, Cecchelli R, Karamanos Y and Flahaut C. En révision dans *Proteomics*.

Cette étude, initiée lors de la thèse du Docteur Gwënaël Pottiez, concerne la comparaison et la quantification, par une approche 2D-DIGE (pH 4-7, 100 à 10 kDa), des protéines issues des deux conditions cellulaires. Sur 129 spots protéiques possédant une variation quantitative statistique d'au moins 20 %, 112 ont été analysés par spectrométrie de masse et 51 d'entre eux, correspondant à 17 protéines distinctes ont été identifiés. Au final, cette étude montre à nouveau un changement quantitatif de l'expression de protéines impliquées dans la structure et la motilité cellulaire mais surtout tend à montrer la probable implication d'une boucle de régulation cellulaire particulière dans la ré-induction du phénotype BHE. En effet, bien que les concentrations cellulaires de diméthylarginine asymétrique (ADMA), acide aminé issu de la dégradation cellulaire des protéines, ne soient pas statistiquement différentes d'une condition à l'autre, nous apportons des preuves tangibles que la présence des cellules gliales induit, entre autres, la sur-expression de la diméthylarginine diméthylaminohydrolase-1 (DDAH-1). Cette enzyme est responsable de l'élimination, par métabolisation cellulaire, de l'ADMA en citrulline et diméthylamine. L'ADMA module un grand nombre de fonctions endothéliales (incluant la migration cellulaire, la fonction de barrière, l'angiogenèse, la diminution de la fluidité membranaire et la réduction de la production d'oxyde nitrique (NO)). Parallèlement la concentration d'arginine intracellulaire, précurseur du NO, est notablement plus faible dans les BCECs aux propriétés de BHE ré-induites. Ainsi, puisque l'ADMA est l'inhibiteur compétitif endogène des *nitric oxide synthase* endothéliales (eNOS), nous pensons que la boucle de régulation ADMA, DDAH, Arginine et eNOS pourrait être impliquée dans les processus cellulaires de ré-induction du phénotype BHE. Nous menons actuellement des expériences complémentaires de dosage de l'ADMA, de l'arginine, du NO et de quantification par western blot à partir de notre modèle *in vitro* de BHE.

De plus, l'action du NO est influencée par les cellules gliales qui réduisent le taux endothélial de glutathion connu pour réagir avec NO et O_2^- . De manière intéressante, nous montrons que la protéine présentant la différence d'abondance la plus marquée est une protéine régulée par le pouvoir redox du cytosol. Cette protéine appartient à la famille des *chloride ion channel proteins* (CLIC) qui ont la particularité d'être exprimées sous forme soluble mais de transloquer, lors de la survenue de conditions oxydantes, dans les membranes

cellulaires où elles forment un canal ionique actif. Le potentiel redox intracellulaire serait donc réduit dans les BCECs cultivées en présence de cellules gliales. Néanmoins cette hypothèse se doit d'être expérimentalement confirmée.

Étude 4 :

A large-scale electrophoresis- and chromatography-based determination of gene expression profiles in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties.

Pottiez G, **Deracinois B**, Duban-Deweir S, Cecchelli R, Fenart L, Karamanos Y, Flahaut C. (2010), *Proteome Science*, 8 : 57.

Cette quatrième étude avait pour but d'établir un « protéome référence » des BCECs possédant un phénotype BHE ré-induit (condition co-culture), grâce à la combinaison d'une approche par 2D-PAGE et d'une approche par nano-LC. L'analyse par 2D-PAGE des protéines solubles dans le Triton X-100 a permis de dénombrer pas moins de 1000 spots protéiques (pH 4-7, 100 à 10 kDa). L'analyse par spectrométrie de masse des 384 spots les plus remarquables a conduit à l'identification de 215 d'entre eux, correspondant à 130 protéines distinctes. La difficulté d'identifier des protéines en faible quantité piégées au sein d'une matrice de séparation ajoutée aux inconvénients précédemment évoqués des approches protéomiques par gel d'électrophorèse, nous ont conduits à développer une approche « hors gel » complémentaire (approche chromatographique), plus simple et moins coûteuse. Cette analyse chromatographique a permis l'identification de 350 protéines (dont 50 communes avec l'approche 2D-PAGE) démontrant ainsi la complémentarité des deux approches (2D-PAGE et LC).

Nous disposons au laboratoire d'un modèle *in vitro* de BHE qui s'avère être un outil précieux pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires des BCECs. Les premières études protéomiques, basées sur ce modèle, ont porté sur la comparaison du protéome « cytoplasmique » (protéines solubles dans 1 % de Triton X-100) des BCECs co-cultivées à celui des mêmes cellules mais cultivées seules (BCECs solo-cultivées). Elles nous ont permis d'identifier des protéines d'intérêt impliquées dans le phénotype BHE.

En raison des difficultés inhérentes à l'utilisation des gels d'électrophorèse, notre stratégie, au commencement de ma thèse, était ainsi de comparer le protéome « cytoplasmique » des BCECs solo-cultivées avec celui des BCECs co-cultivées par une approche nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS afin de compléter les quatre études déjà réalisées et identifier des protéines d'intérêt, jusqu'ici non identifiées par des approches « en gel ».

Chapitre II

Le fractionnement organique des protéines

Sommaire

1. Première approche sur l'extrait total de protéines	- 107 -
2. Approche par fractionnement préalable des protéines	- 108 -
2.1. Principe du fractionnement organique.....	- 109 -
2.2. Évaluation de la reproductibilité et de l'efficacité du fractionnement.....	- 109 -
3. Discussion	- 112 -

La vérification, à chaque récupération cellulaire, de la ré-induction des propriétés de BHE à la suite de 12 jours de co-culture en comparaison à 12 jours de solo-culture est primordiale pour notre approche protéomique différentielle. Dès lors, les BCECs sont dissociées de la matrice extracellulaire servant de support de culture, par traitement enzymatique à la collagénase selon le protocole décrit (Pottiez *et al.*, 2009). Les BCECs solo-cultivées ou co-cultivées sont lysées par déstructuration des membranes à l'aide d'un tampon contenant un détergent doux, le Triton X-100, associé à une action mécanique. Après centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant est collecté et les protéines, solubilisées par le Triton X-100, sont concentrées et délipidées par précipitation organique.

1. Première approche sur l'extrait total de protéines

Les protéines précipitées sont solubilisées dans 100 µl de bicarbonate d'ammonium 20 mM puis soumises à une digestion trypsique en solution. Le mélange de peptides générés est ensuite séparé directement par nano-LC en phase inverse (gradient d'ACN de 200 min correspondant à 380 fractions éluées), « couplée » (*off line*) à un spectromètre de masse de type MALDI-TOF/TOF. A partir de ces 380 fractions, l'analyse MALDI-TOF/TOF-MS des peptides issus de la condition solo-cultivée, fournit en moins de 3 h la mesure des rapports de m/z correspondant à 12933 composés détectés. Cette complexité peptidique est illustrée par la carte peptidique (Figure 15) représentant les peptides élués selon leur rapport de m/z et leur temps d'élution. Cette carte permet d'obtenir une vue rapide de la séparation chromatographique. Parmi ces composés, moins de 21 %, de qualité spectrale suffisante, ont été fragmentés permettant uniquement l'identification de quelques protéines majoritaires. Ces protéines sont des protéines abondantes des CEs, dont des protéines structurales (actine, vimentine, vinculine, tubuline et myosine) ou encore des protéines du choc thermique. Ce faible taux d'identification est dû en partie à la quantité importante de peptides générés par la digestion trypsique du mélange très complexe de protéines extraites. Dès lors, la résolution chromatographique n'est pas suffisante (beaucoup de peptides dans un même spot chromatographique) et conduit à l'obtention de spectres de masse complexes associée à l'apparition de phénomènes de suppression d'ionisation lors des mesures en masse et par conséquent à un faible taux d'identification. Ce dernier est également dépendant du type de spectromètre de masse dont nous disposons.

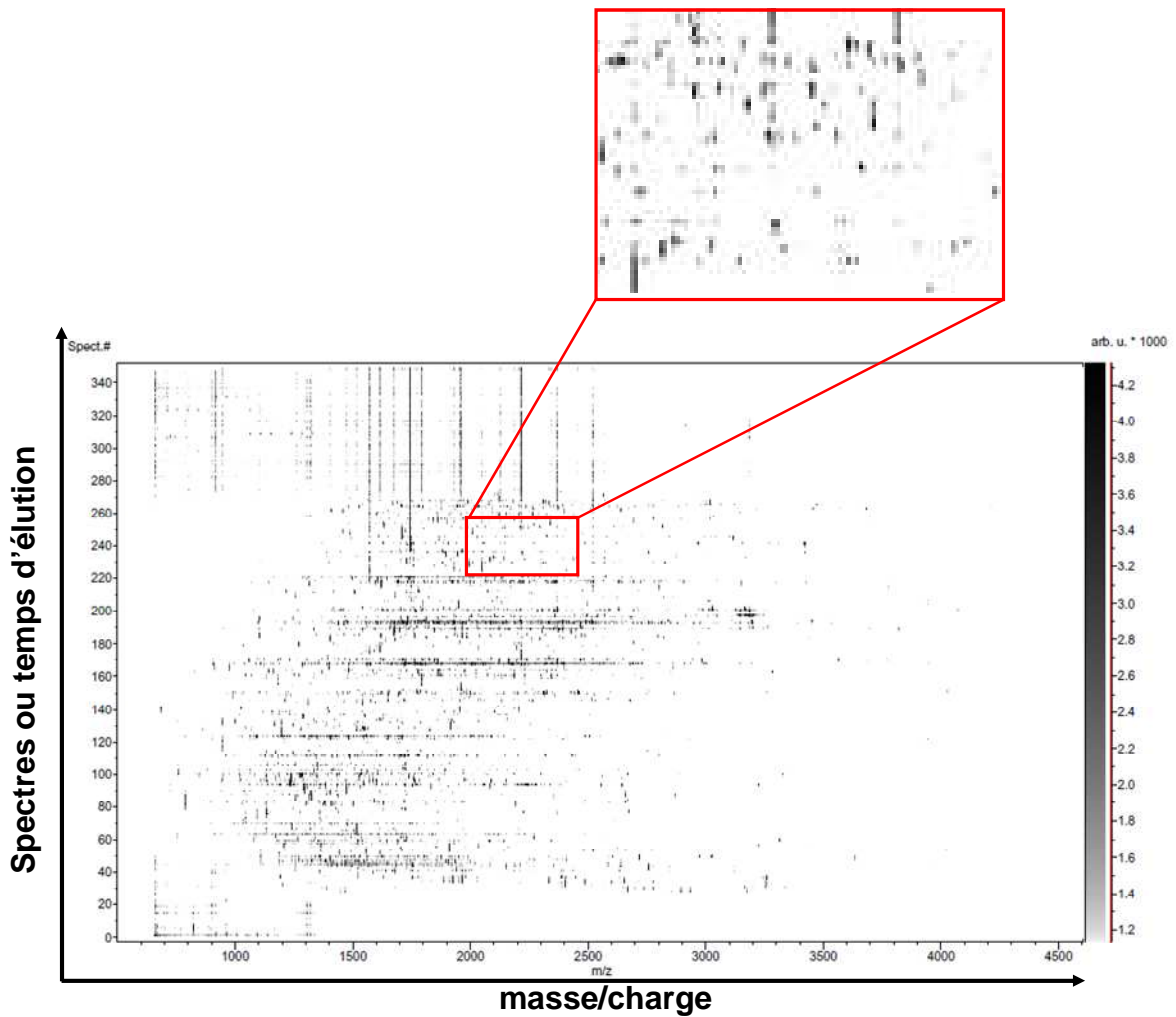


Figure 15 : Cartes peptidiques obtenues après élution en nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS des peptides issus du pool de protéines solubles dans le Triton X-100 des BCECs solo-cultivées.

L'axe des ordonnées reprend la succession des spectres de masse des différents temps d'élution, le ratio de masse/charge des ions détectés est représenté sur l'axe des abscisses et l'intensité des pics est représentée par l'intensité des niveaux de gris. Un spectre de masse correspond à l'élution des peptides pendant 30 s. L'encadré rouge représente un agrandissement de la carte montrant la multitude de peptides de rapport de m/z compris entre 2000 et 2500 collectés en 20 min.

2. Approche par fractionnement préalable des protéines

La mauvaise résolution analytique d'un échantillon biologique peut être palliée par l'introduction préalable d'une étape supplémentaire de fractionnement. Nous avons opté pour une stratégie de fractionnement des protéines avant leur digestion enzymatique. Afin d'augmenter la robustesse de cette stratégie protéomique, les analyses de nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS ont été répétées à partir de trois séries expérimentales (réplicats biologiques).

2.1. Principe du fractionnement organique

Le fractionnement utilisé consiste en une simple solubilisation fractionnée des protéines extraites au Triton X-100 selon leur hydrophobicité (gradient discontinu en 5 étapes de concentration croissante en ACN) (Figure 16). Il en résulte cinq fractions notées F0, F25, F50, F75 et F100 selon le pourcentage d'ACN utilisé pour la solubilisation des protéines. Le culot final restant est solubilisé dans une solution de bicarbonate d'ammonium (fraction FCA).

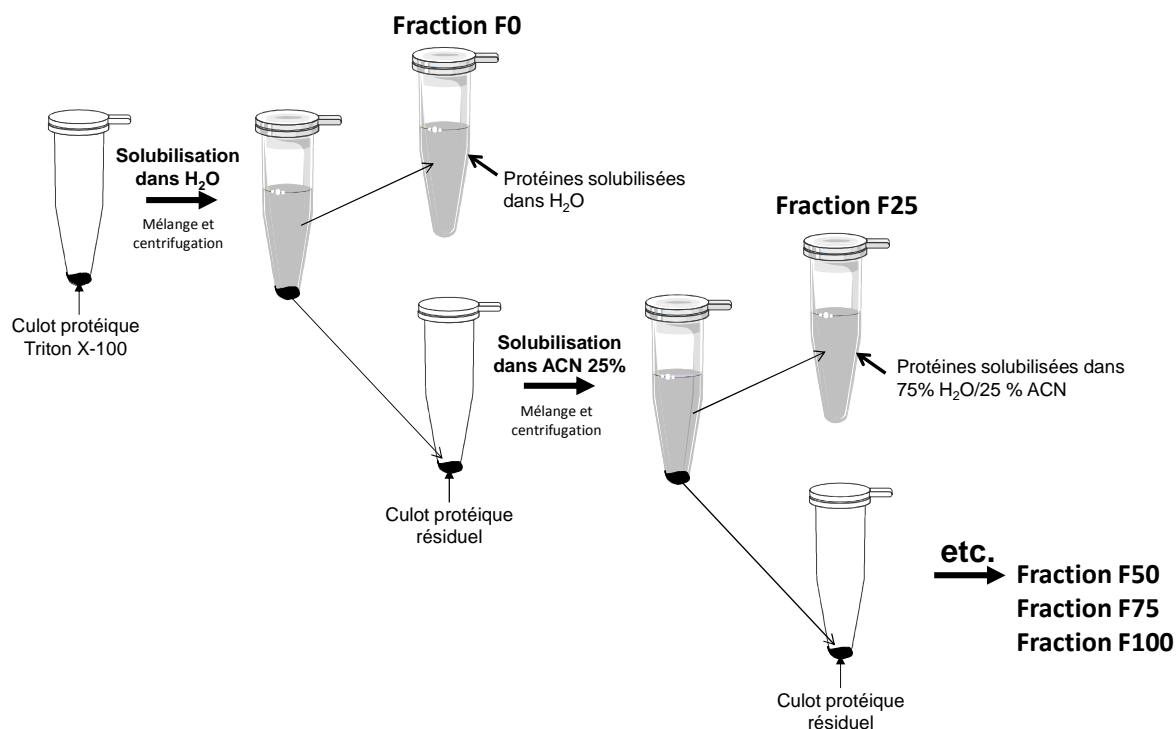


Figure 16 : Représentation schématique du fractionnement organique en acétonitrile.

Les protéines extraites au Triton X-100 des BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) ou co-cultivées (Re-ind. BBB) sont fractionnées en 5 sous-fractions (F0, F25, F50, F75 et F100) en utilisant un gradient par palier d'acétonitrile (ACN) (solubilisation fractionnée en ACN) (0 %, 25 %, 50 %, 75 % et 100 %, respectivement). Illustration réalisée grâce à *Servier Medical Art*.

2.2. Évaluation de la reproductibilité et de l'efficacité du fractionnement

2.2.1. Dosage des protéines après fractionnement

Les protéines issues du fractionnement sont dosées selon la méthode de Peterson (Peterson, 1977). Comme indiqué dans la Figure 17, seules les fractions F0 à F75 contiennent une concentration protéique allant de 2 jusqu'à 0,1 µg/µl. La concentration des fractions F100 et FCA est inférieure au seuil de détection (ces fractions ne contiennent que quelques protéines cellulaires majoritaires et ne sont donc pas étudiées par la suite). Les fractions homologues (Lim. BBB / Re-ind. BBB) ne montrent pas de différence significative et sont donc équivalentes en termes de quantité de protéines.

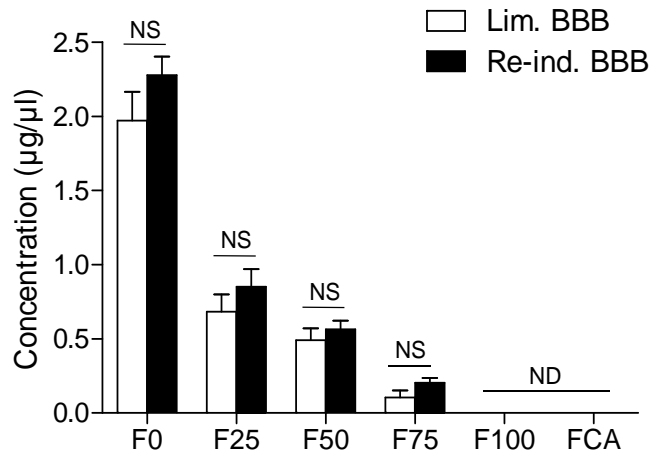


Figure 17 : Concentration protéique après fractionnement en acétonitrile.

Les protéines des cellules solo-cultivées (Lim. BBB) et co-cultivées (Re-ind. BBB), issues du fractionnement organique, sont dosées selon la méthode de Peterson. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel PRISM 5. Les données correspondent à la moyenne \pm SEM des trois séries expérimentales. NS : non-significatif (analyse de la variance à deux facteurs suivie d'un test *post hoc* de Bonferroni) ; ND, non détectable.

2.2.2. Analyse par 1D-PAGE du fractionnement

Une première analyse qualitative de ces fractions est réalisée par 1D-PAGE afin d'évaluer la répartition générale des protéines selon leur MM. Des échantillons (10 µg) des fractions F0 à F75 des trois séries expérimentales sont déposés sur gel 1D-PAGE et la révélation des protéines est réalisée par coloration au nitrate d'argent.

Quelles que soient les BCECs considérées, l'image des gels obtenus (Figure 18) montre que les profils de séparation diffèrent d'une fraction à une autre. Une ressemblance est cependant rapportée pour les fractions F50 et F75. Néanmoins, les profils de séparation pour une fraction donnée restent similaires pour les deux conditions cellulaires. Comme attendu, la fraction F0 renferme plus de protéines de faible MM apparente comparée aux autres fractions pour lesquelles les protéines de MM apparente supérieure à 150 kDa sont clairement visibles sur le gel (flèches bleues). Bien que la séparation électrophorétique selon le seul critère de la MM ne soit pas très résolutive, de nombreuses bandes de protéines sont retrouvées d'une fraction à l'autre. Un différentiel est néanmoins observable entre les protéines issues des BCECs solo-cultivées ou co-cultivées. Comme le montrent les flèches rouges, une protéine de MM apparente de 54 kDa est retrouvée au niveau de chaque fraction avec une intensité de coloration nettement plus marquée dans les fractions issues des BCECs co-cultivées. Inversement, une protéine de MM apparente de 33 kDa est plus abondante dans les fractions F25 à F75 issues des BCECs solo-cultivées. Les trois gels 1D-PAGE, provenant de trois extractions différentes, montrent une bonne reproductibilité de l'étape de préparation (extraction et fractionnement) des protéines.

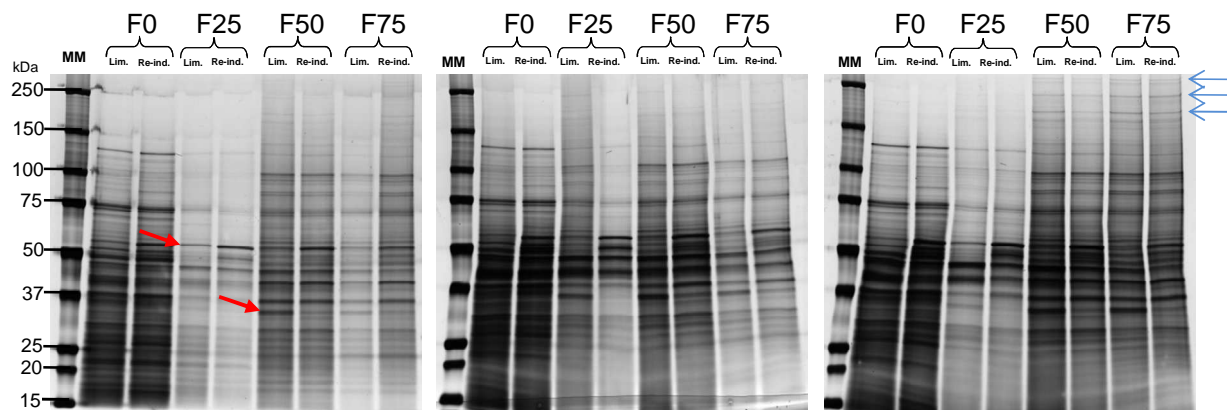


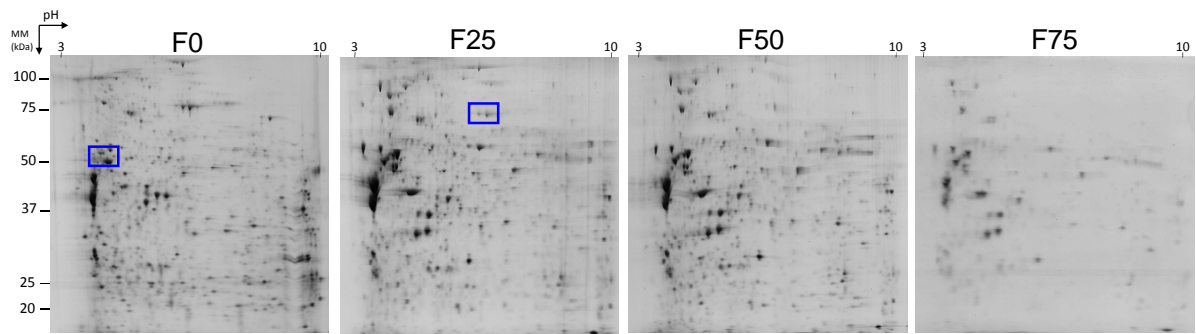
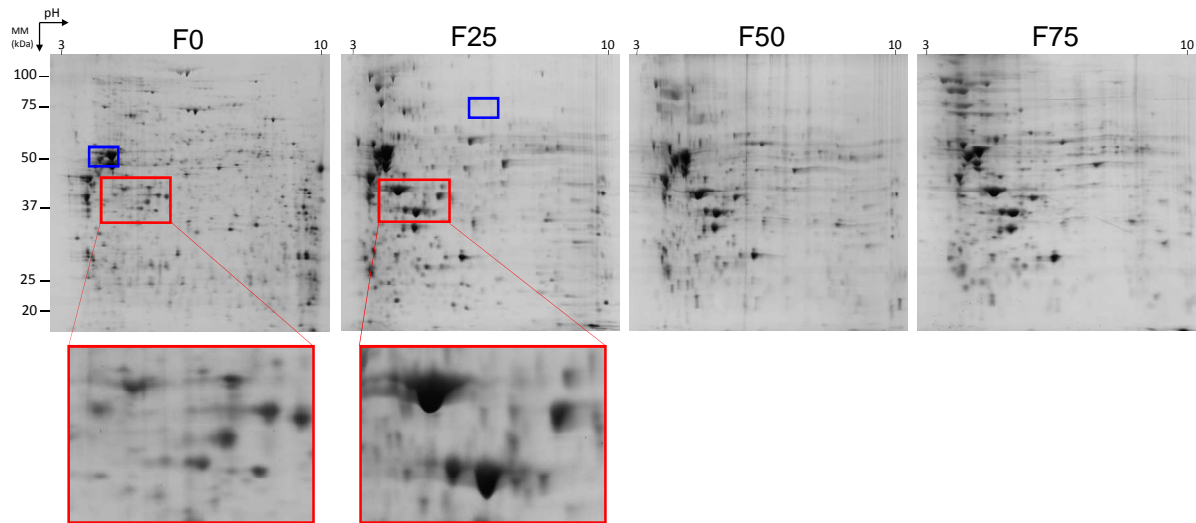
Figure 18 : Analyse qualitative du fractionnement par 1D-PAGE.

Images des gels 1D-PAGE (4-12 %) des protéines issues du fractionnement organique révélées au nitrate d'argent. Les trois gels représentent une extraction sur des lots cellulaires différents (séries expérimentales biologiques) de BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) ou co-cultivées (Re-ind. BBB). Les flèches bleues montrent des protéines de masse moléculaire apparente élevée. Les flèches rouges montrent deux exemples de protéines exprimées différemment entre les deux conditions.

2.2.3. Analyse par 2D-PAGE du fractionnement organique

Une deuxième analyse qualitative du fractionnement, cette fois-ci par 2D-PAGE, nous permet d'obtenir une idée sur la répartition globale des protéines (selon leur pI et leur MM) dans chaque fraction (Figure 19). Les protéines (80 à 10 µg selon les fractions) des fractions F0 à F75 sont séparées sur gel 2D-PAGE et la révélation est réalisée par coloration au nitrate d'argent.

Les profils de séparation électrophorétique sont nettement différents entre les fractions F0 et les autres fractions comme illustré par l'agrandissement de la Figure 19. Ils restent cependant superposables entre les fractions F25 à F75. L'observation deux à deux des fractions homologues des deux conditions cellulaires fait ressortir (à l'œil nu) certaines différences (rectangles bleus) (comme en 1D-PAGE). Pour autant, les comparaisons statistiques à l'aide de logiciels d'alignement n'ont pas été effectuées étant donné que notre étude ne se base pas sur une approche « en gel ».

A Lim. BBB**B** Re-ind. BBB**Figure 19 : Analyse qualitative du fractionnement par 2D-PAGE.**

Images des gels 2D-PAGE (10 %, pH 3-10) des protéines issues du fractionnement organique des BCECs solo-cultivées (A, Lim. BBB) ou co-cultivées (B, Re-ind. BBB). Les protéines sont révélées au nitrate d'argent. Les encadrés rouges montrent un agrandissement d'une zone des gels des fractions F0 et F25 issues des BCECs co-cultivées. Les rectangles bleus montrent deux exemples de spots différentiels entre les deux conditions cellulaires.

3. Discussion

A la suite de la séparation chromatographique des hydrolysats tryptiques obtenus à partir des protéines solubilisées au Triton X-100 et de l'analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, plus de 12900 peptides ont été détectés. Cependant, la très grande majorité des expériences de fragmentation se sont révélées inefficaces comme en atteste le faible nombre de protéines identifiées et la valeur des scores Mascot apparentés (données non montrées ici). Dès lors, l'approche différentielle que nous avons envisagée apparaissait compromise de par les limites résolutive de l'approche par nano-LC à une seule dimension. Nous avons pour cette raison choisi d'effectuer un fractionnement préalable des protéines (avant l'étape de digestion tryptique) afin de simplifier les extraits totaux de protéines solubilisées par le Triton X-100. Plusieurs critères de fractionnement s'offraient à nous. Même

miniaturisé, le fractionnement des protéines selon leur encombrement stérique par chromatographie d'exclusion est inadapté à la nature de nos échantillons, car d'un trop faible rendement. Une deuxième méthode, consistant à séparer les protéines selon leur charge par chromatographie ionique aurait pu être envisagée. Cependant, les gradients salins ou de pH utilisés pour l'élution des protéines imposent une étape supplémentaire de précipitation des protéines avant de réaliser les digestions trypsiques, provoquant de nouvelles pertes de matériel loin d'être négligeables. En définitive, nous avons opté pour un fractionnement selon l'hydrophobie des protéines qui ne présente aucun des désavantages mentionnés ci-dessus. Les protéines extraites à partir des BCECs solo-cultivées ou co-cultivées sont fractionnées par un gradient discontinu d'ACN par paliers de 25 % (fraction F0 à F100). Les protéines résiduelles sont solubilisées dans une solution de bicarbonate d'ammonium (fraction FCA).

L'analyse qualitative par 1D-PAGE et 2D-PAGE des fractions F0 à F75 illustre l'efficacité du fractionnement et permet de conclure à une répartition graduelle des protéines au cours de celui-ci. En effet, les analyses 1D-PAGE nous permettent de visualiser, pour les fractions F0 des protéines de faible MM apparente (< à 25 kDa) et à l'opposé, pour les fractions F50 et F75 des protéines de MM apparente élevée (> 150 kDa). Ces protéines de haute MM, non visualisées en 2D-PAGE, peuvent correspondre à des protéines plutôt hydrophobes, de taille généralement élevée et solubles dans l'ACN. À l'inverse, celles de faible MM seraient des protéines plutôt hydrophiles, solubles dans l'eau. Les analyses 2D-PAGE mettent également en évidence une différence de profil entre la fraction F0 et les autres fractions. Bien que la séparation électrophorétique selon le seul critère de la MM ne soit pas très résolutive, de nombreuses protéines fortement colorées au nitrate d'argent se retrouvent dans une partie, voire dans toutes les fractions. A la vue de leur MM apparente, ces protéines correspondent sans nul doute aux protéines majeures du cytosol de la cellule, comme l'actine (42 kDa) et la vimentine (53 kDa). Contrairement à ce qui était attendu, cette méthode de fractionnement ne permet pas d'enrichir l'une des fractions (et par conséquent de simplifier les autres fractions) en ces protéines gênantes en protéomique de par leur abondance. Au final, la superposition 2 à 2 des profils électrophorétiques (entre les trois séries expérimentales (par 1D-PAGE) mais également entre les deux conditions cellulaires (par 1D-PAGE et 2D-PAGE)) témoigne de la reproductibilité du fractionnement organique des protéines.

La séparation chromatographique à une dimension des peptides issus des protéines de BCECs solubilisées par le Triton X-100, suivie de leur analyse par MALDI-TOF/TOF-MS ont été infructueuses. En effet, en raison d'une très importante hétérogénéité peptidique de ces extraits, seules quelques protéines majoritaires ont pu être identifiées.

La simplification de nos extraits protéiques a ainsi été une étape nécessaire pour notre approche protéomique « hors gel ». Le fractionnement organique que nous avons choisi nous permet de réduire très simplement l'hétérogénéité protéique de nos échantillons, engendrant un minimum de perte de matériel tout en restant compatible avec les analyses par chromatographie et spectrométrie de masse.

Les deux chapitres suivants présentent les travaux réalisés sur ce fractionnement par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS.

Chapitre III

Stratégie protéomique comparative sans marquage pour l'identification de protéines issues des BCECs et induites par les cellules gliales : implication de la TNAP et de l'EHD1 dans le phénotype BHE

Sommaire

1. Analyse par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS des hydrolysats tryptiques des fractions	- 118 -
1.1. Cartes peptidiques	- 118 -
1.2. Homogénéité des données de spectrométrie de masse.....	- 120 -
1.3. Analyse globale des protéines identifiées	- 121 -
2. Analyses biochimiques de deux protéines d'intérêt : la phosphatase alcaline tissu-non spécifique (TNAP) et la protéine 1 contenant un domaine d'homologie à Eps15 (EHD1)	- 126 -
2.1. Immunocytochimie	- 126 -
2.2. RT-PCR et western blot	- 127 -
2.3. Activité enzymatique de l'AP et inhibition de la TNAP par le levamisole.....	- 130 -
3. Discussion	- 134 -
3.1. Extraction des protéines solubles dans le Triton X-100	- 134 -
3.2. Avantages et inconvénients des analyses chromatographiques.....	- 134 -
3.3. Identifications protéiques	- 135 -

Au commencement de la thèse, notre objectif était de comparer le protéome « cytoplasmique », extrait par un tampon contenant 1 % de Triton X-100, des BCECs cultivées seules (Lim. BBB) ou en présence de cellules gliales (Re-ind. BBB), par une approche « hors gel ». Ce sous-protéome, après fractionnement organique puis digestion trypsique, a ainsi été analysé par nano LC MALDI-TOF/TOF-MS. Notre première stratégie protéomique pour l'identification de protéines induites par la présence des cellules gliales au sein des BCECs est schématisée dans la Figure 20. Globalement, cette stratégie consiste à confronter et comparer les listes de protéines obtenues après analyses chromatographiques et spectrométrie de masse des extraits issus des BCECs solo-cultivées et co-cultivées. Les résultats obtenus dans cette étude ont fait l'objet d'une publication acceptée en septembre 2012 dans le journal PLoS one (ajoutée à la suite du chapitre) (Deracinois *et al.*, 2012).

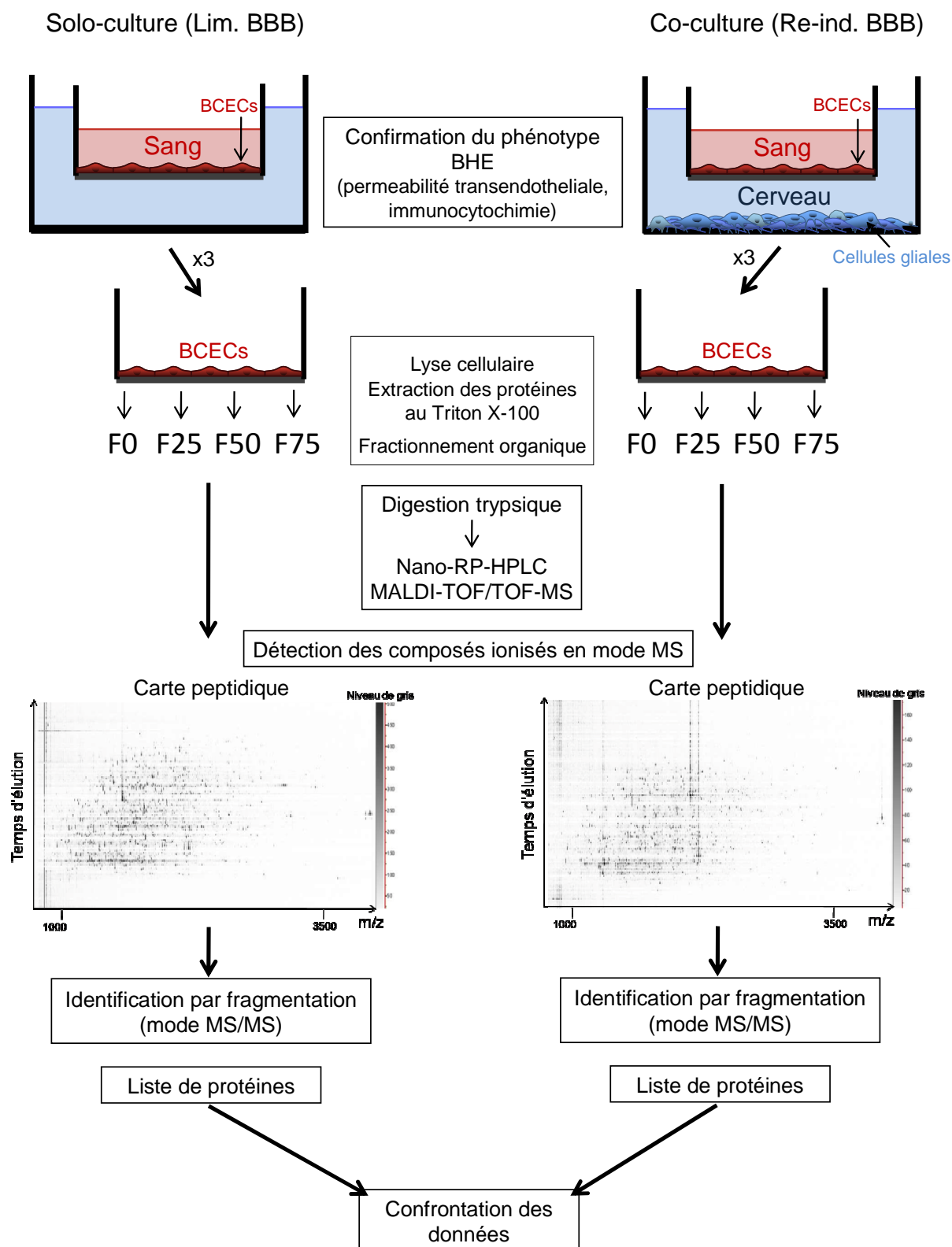


Figure 20 : Schéma illustrant la stratégie protéomique sans marquage.

Les BCECs des deux systèmes de culture à comparer (solo-culture, Lim. BBB et co-culture, Re-ind. BBB) sont lysées par un tampon contenant 1 % de Triton X-100. Les protéines extraites sont fractionnées à l'aide d'acétonitrile. Les fractions protéiques sont soumises à une protéolyse trypsique suivie d'une analyse en nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS. Le mode MS permet la détection des différents composés ionisés visualisables sur la carte peptidique (rapport de m/z en fonction du temps d'élution) alors que le mode MS/MS permet la fragmentation des peptides pour l'identification des protéines. La stratégie utilisée ici consiste à comparer les listes de protéines obtenues pour la mise en évidence de protéines d'intérêt.

1. Analyse par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS des hydrolysats tryptiques des fractions

Les fractions protéiques F0 à F75 préparées à partir des BCECs solo-cultivées ou co-cultivées sont soumises à une digestion tryptique en solution. Les 8 hydrolysats obtenus (pour chaque série expérimentale) sont alors séparés par nano-LC de 200 min en phase inverse. Les fractions, collectées toutes les 30 s (380 fractions), sont co-cristallisées en présence de matrice (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique ou CHCA) avant analyse MALDI-TOF/TOF-MS.

1.1. Cartes peptidiques

L'hétérogénéité peptidique de chaque fraction chromatographiée est évaluée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Comme souligné dans la Figure 21, l'élution des peptides, corrélée à la mesure de leur rapport de m/z , établit à la manière des gels d'électrophorèse des cartographies peptidiques détaillées. Une carte peptidique permet de représenter la répartition de l'ensemble des composés détectés par le spectromètre de masse (théoriquement l'ensemble des peptides ionisés) en fonction de leur temps d'élution et de leur rapport de m/z . La comparaison deux à deux de ces cartes (à la fois selon la condition cellulaire mais également selon la fraction analysée) montre encore une fois des profils superposables et une répartition homogène de ces composés entre chaque fraction et condition cellulaire.

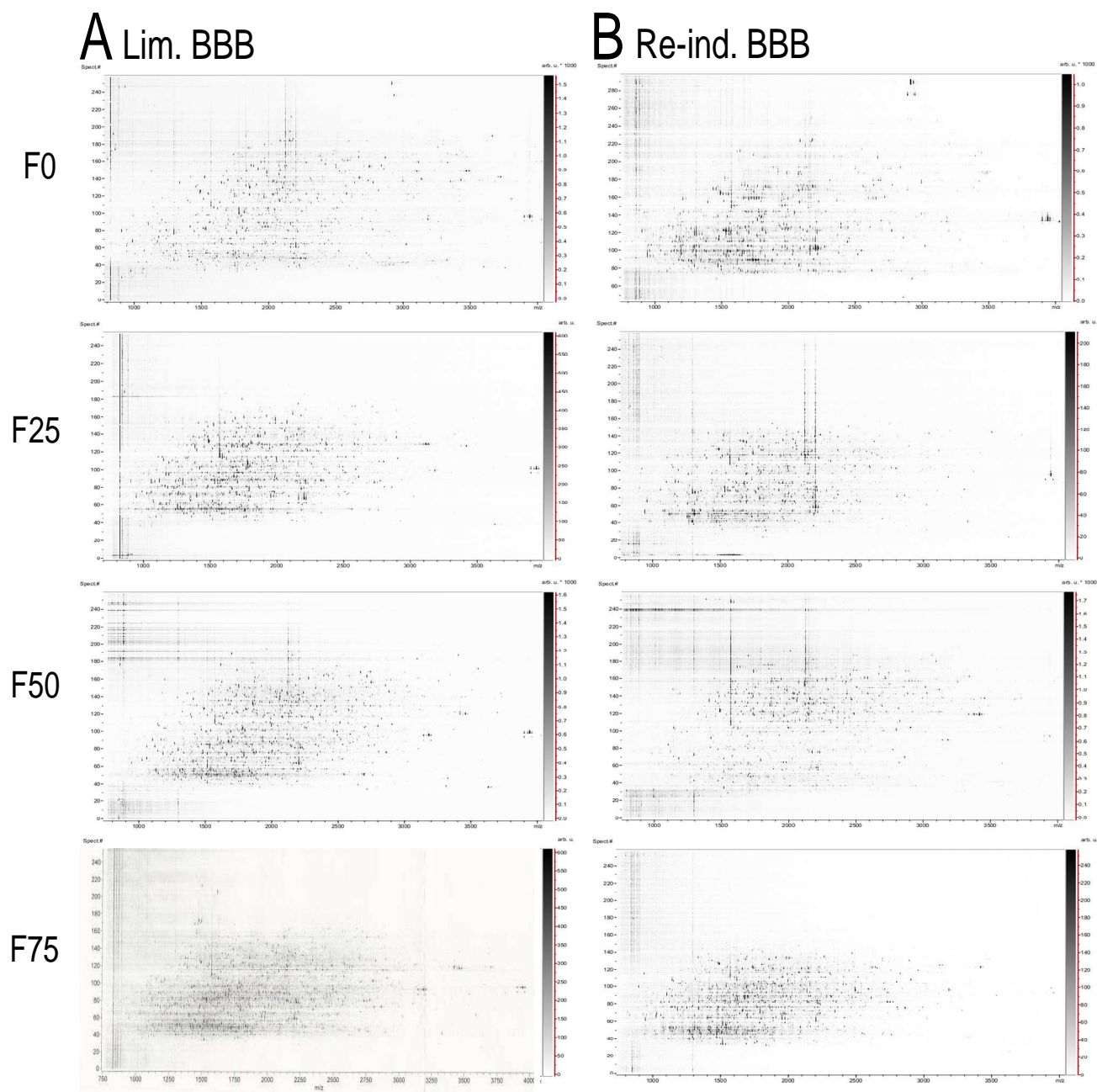


Figure 21 : Cartes peptidiques obtenues (stratégie *label free*).

Cartes peptidiques générées après analyses nano-LC MALDI-TOF-MS des différentes fractions (F0 à F75) issues des BCECs solo-cultivées (A, Lim. BBB) ou co-cultivées (B, Re-ind. BBB). L'axe des ordonnées correspond au temps de rétention chromatographique (exprimé par le nombre de spectre (Spect #) correspondant aux différents spectres MS des 260 premiers dépôts chromatographiques). L'axe des abscisses reprend le ratio de m/z des ions peptidiques détectés. L'abondance du signal peptidique est codée par une échelle de gris (représentée à droite des cartes peptidiques), plus le signal est important plus il apparaîtra foncé.

1.2. Homogénéité des données de spectrométrie de masse

Comme indiqué par les histogrammes de la Figure 22, quelle que soit la condition cellulaire, le nombre de composés détectés, de même que le nombre de fragmentations (MS/MS) réalisées, ne diffèrent pas de manière significative d'une condition à l'autre et d'une fraction à l'autre. En moyenne, entre 5000 à 8000 composés sont détectés (principalement des peptides) selon la fraction (Figure 22 A) dont moins de 16 % (environ 1000 peptides) ont été fragmentés (Figure 22 B). Parmi ces peptides fragmentés, 49,9 % ($\pm 10,0$) n'ont pas été identifiés.

Dans un souci de fiabilité, les listes de protéines identifiées sont établies sur la base des recommandations de la communauté internationale dans le domaine de la protéomique, en incluant cependant les protéines identifiées avec un peptide unique mais spécifique d'une seule protéine, auxquelles nous avons ajouté l'exigence d'une double identification (parmi chaque fraction ou série expérimentale). Le pourcentage de faux positifs (*false discovery rate* ou FDR) relatif aux identifications sous Mascot a été calculé avec l'option *decoy* et est en moyenne de 3 % (± 0.87). Les données issues de ces analyses sont disponibles dans la base de données d'identifications protéomiques (PRIDE) sous les numéros d'accès 22489 à 22498 (Vizcaíno *et al.*, 2010). Le pouvoir discriminant de la technique d'identification des protéines par PFF permet d'identifier en moyenne environ 200 protéines pour F0 et F50 et 150 protéines pour F25 et F75 (Figure 22 C). De nouveau, aucune différence significative n'est observée entre les deux conditions cellulaires. Comme démontré par les écarts-type reportés dans la Figure 22, les mesures de masse tout comme les identifications de protéines sont reproductibles et homogènes. L'ensemble de ces données permet de conclure que cette étude ne présente pas de biais expérimentaux liés aux étapes de fractionnement, de protéolyse, de séparation par chromatographie en phase inverse ou de mesure par spectrométrie de masse. La comparaison de l'ensemble de données relatives aux deux conditions cellulaires est donc légitime.

Parallèlement, la Figure 22 D montre que le pourcentage de protéines identifiées avec un seul peptide est élevé (25 % pour la condition solo-culture et 29 % pour la condition co-culture). Ce pourcentage élevé incombe en partie au type de spectromètre de masse dont nous disposons. En conséquence, l'élimination de ces protéines lors du traitement des identifications aurait engendré une perte d'informations non négligeable. Nous avons alors ajouté l'exigence d'une double identification des protéines (le peptide unique est identifié au moins deux fois) lors de l'analyse en triplicate de chaque fraction.

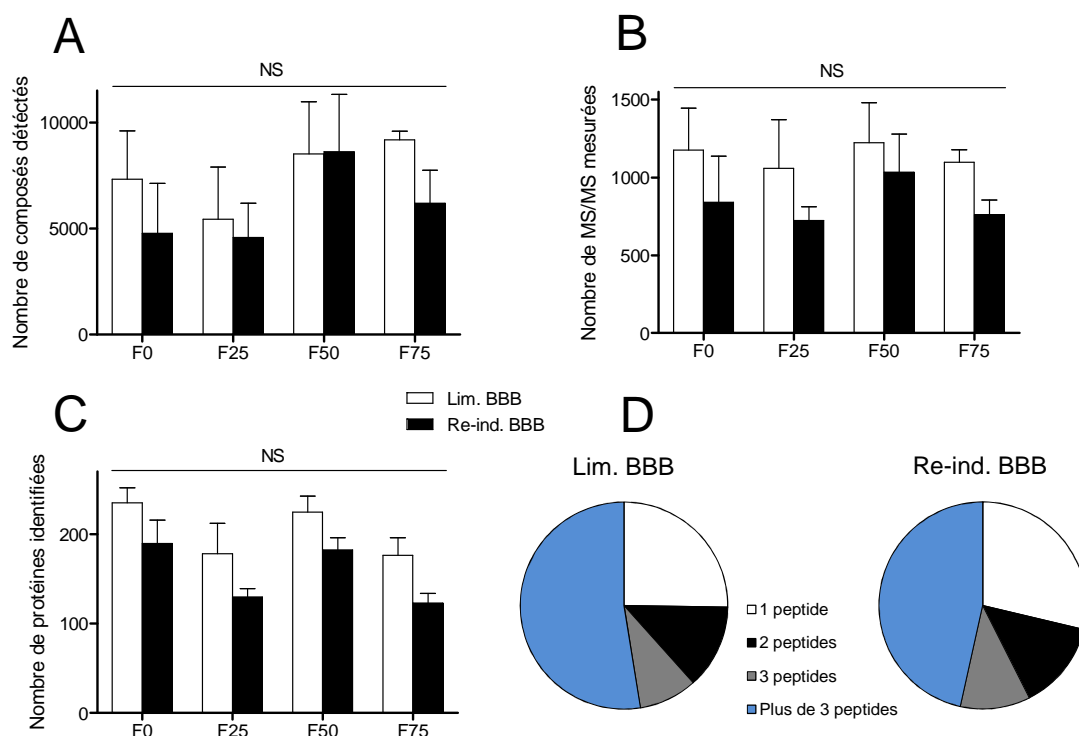


Figure 22 : Évaluation de l'homogénéité des données de masses (stratégie *label free*).

Panneaux A, B et C : histogrammes comparatifs par fraction du nombre de composés détectés (A), de fragmentations mesurées (B) et de protéines identifiées de façon significative et au moins deux fois parmi les séries expérimentales (C) lors de l'analyse nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS. Les protéines fractionnées sont extraites au Triton X-100 des BCECs solo-cultivées (Lim. BBB, représentées en blanc) ou co-cultivées (Re-ind. BBB, représentées en noir). Le tri et l'analyse croisée des listes de protéines ont été réalisés avec le logiciel nwCompare (Pont and Fournié, 2010). L'analyse statistique quant à elle a été réalisée avec le logiciel PRISM 5. Les données correspondent à la moyenne \pm SEM des trois séries expérimentales. NS : non-significatif (analyse de la variance à deux facteurs suivie d'un test *post hoc* de Bonferroni). (D) Nombre de peptides identifiés par protéine d'après le logiciel PRIDE Inspector (Wang *et al.*, 2012).

1.3. Analyse globale des protéines identifiées

Afin d'analyser l'efficacité de l'extraction des protéines cytoplasmiques au Triton X-100, nous avons analysé, à l'aide du système de classification PANTHER (*protein analysis through evolutionary relationships*) (Mi and Thomas, 2009), la répartition (Figure 23) des 447 protéines identifiées selon leur localisation cellulaire (définie par *gene ontology*, GO). Plus de 80 % des protéines identifiées sont des protéines cytoplasmiques (intracellulaires (noyau et cytoplasme) (GO : 0005622 \approx 68,4 %) ou localisées au sein de complexes ribonucléoprotéiques (GO : 0030529 \approx 15 %)), 11,3 % font partie de complexes protéiques (GO : 0043234) (qui peuvent se trouver au sein de la membrane plasmique ou à l'intérieur de la cellule), 3 % sont des protéines extracellulaires (GO : 0005615) et pour finir 2,3 % sont des protéines de la membrane plasmique (GO : 0005886).

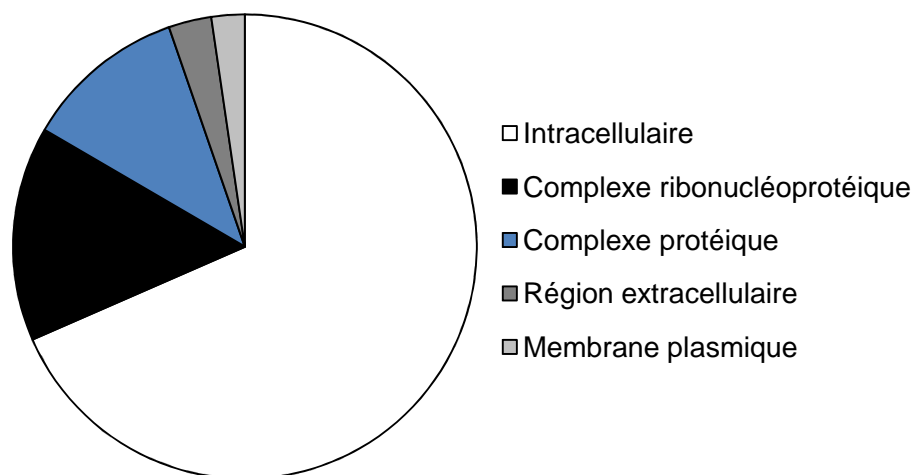


Figure 23 : Classification selon leur localisation cellulaire (composant cellulaire) des 447 protéines identifiées (stratégie *label free*).

Cette classification est effectuée sur la base des données de *gene ontology* grâce au système de classification PANTHER.

Au final, comme le souligne la Figure 24 A, le fractionnement organique des culots cellulaires a permis d'identifier un total de 436 protéines distinctes pour les BCECs solo-cultivées et de 408 pour les BCECs co-cultivées avec 90 % de protéines communes. Un total de 50 protéines (répertoriées dans le Tableau IV) sont identifiées uniquement dans l'un ou l'autre des deux types cellulaires et se répartissent en 78 % pour les BCECs solo-cultivées et 22 % pour les BCECs co-cultivées.

La classification des protéines communes selon les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées (Figure 24 B) montre que 43,5 % d'entre elles sont impliquées dans la communication et les processus cellulaires (GO : 0007154 \approx 28 % ; GO : 0009987 \approx 15 %), 18 % dans la localisation et le transport (GO : 0051179 \approx 10 % ; GO : 0006810 \approx 8 %) et 7 % dans l'organisation des composants cellulaires (GO : 0016043).

Environ 33 % des protéines identifiées dans la fraction F0 sont spécifiques à cette fraction (Figure 24 C et D), contre \approx 15 % pour la fraction F50 issue des BCECs co-cultivées et \approx 7 % pour les autres fractions.

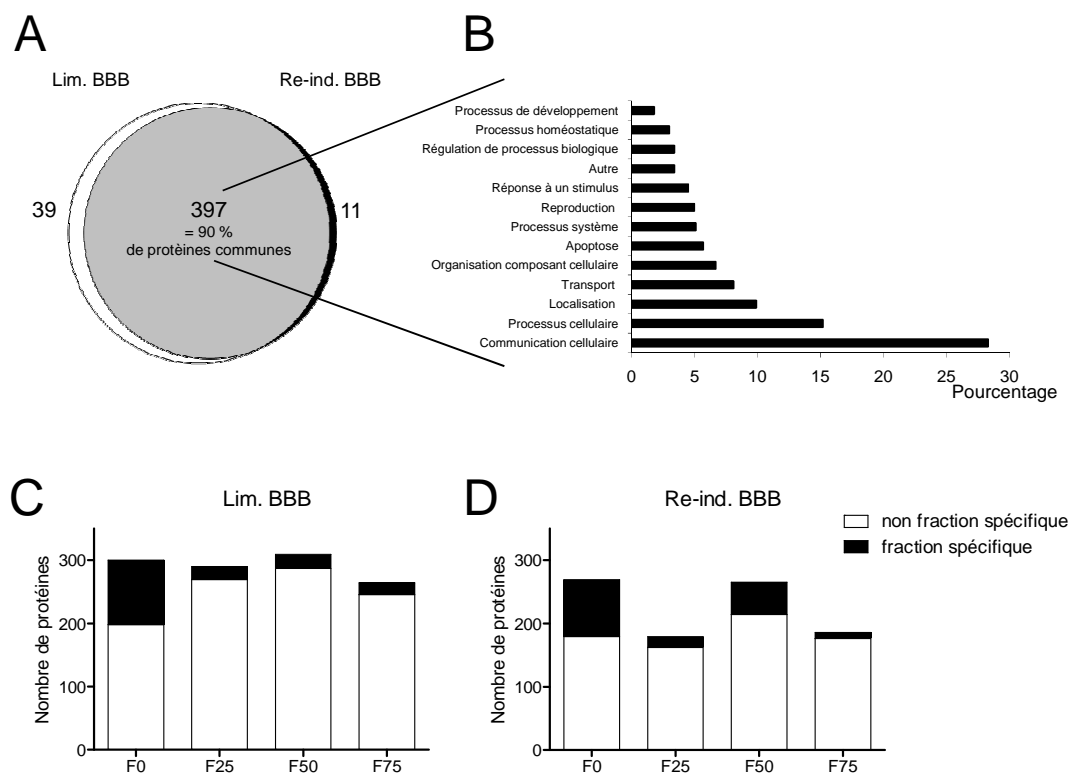


Figure 24 : Évaluation globale des protéines identifiées dans les différentes fractions et séries expérimentales (stratégie label free).

(A) Diagramme de Venn représentant la répartition des 447 protéines identifiées *via* notre stratégie protéomique au sein des BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) ou co-cultivées (Re-ind. BBB). Les protéines retrouvées spécifiquement dans une condition sont représentées en blanc ou noir pour respectivement la condition Lim. BBB (39) et Re-ind. BBB (11). Les protéines communes, retrouvées dans les deux conditions cellulaires sont représentées en gris (397). (B) Classification des protéines communes identifiées selon les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées grâce au système de classification PANTHER. (C) et (D) Histogrammes comparant le nombre de protéines identifiées par fraction avec les protéines identifiées spécifiquement dans une fraction (en noir) et les protéines identifiées dans au moins deux fractions (en blanc). Le tri et l'analyse croisée des listes de protéines ont été réalisés avec le logiciel nwCompare.

Tableau IV : Liste des protéines identifiées (au moins deux fois parmi chaque fraction ou les trois analyses nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS) spécifiquement dans l'une des deux conditions (Lim. BBB ou Re-ind. BBB) et pas dans la seconde.

Nom de la protéine	Accession Swiss-Prot	Gene name	Numéro d'accèsion	Masse moléculaire (Da)	Point isoélectrique	Score d'identification ^a	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptide fragmenté	Nombre de fraction	Identifiée uniquement en ^b
Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHEB_BOVIN	ABHD14B	A7YY28	22 441	6,05	43,9	13	2	2	Re-ind. BBB
ADP-ribosylation factor 4	ARF4_BOVIN	ARF4	Q3SZF2	20 515	5,91	159,7	20,11	2	2	Re-ind. BBB
EH domain-containing protein 1	EHD1_BOVIN	EHD1	Q5E9R3	60 644	6,4	75,7	4,66	2	2	Re-ind. BBB
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	OST48_BOVIN	DDOST	A6QPY0	48 761	5,52	40,7	3,41	1	2	Re-ind. BBB
Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	PPBT_BOVIN	ALPL	P09487	57 156	6,28	42,5	6,1	2	2	Re-ind. BBB
SUMO-activating enzyme subunit 1	SAE1_BOVIN	SAE1	A2VE14	38 281	5,15	84,3	2,77	1	2	Re-ind. BBB
Splicing factor, arginine/serine-rich 9	SFRS9_RAT	SFRS9	Q5PPI1	25 482	8,67	33,5	5,42	1	2	Re-ind. BBB
Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	SMHD1_MOUSE	SMCHD1	Q6P5D8	225 506	6,87	41,2	2,7	2	2	Re-ind. BBB
Thioredoxin-related transmembrane protein 2	TMX2_BOVIN	TMX2	Q2TBU2	34 007	8,89	89,4	5	1	2	Re-ind. BBB
Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_BOVIN	TPM1	Q5KR49	32 675	4,69	48,1	2,77	1	3	Re-ind. BBB
Xanthine dehydrogenase/oxidase	XDH_BOVIN	XDH	P80457	146 696	7,97	116,5	3,23	3	3	Re-ind. BBB
26S protease regulatory subunit 6A	PRS6A_RAT	Psmc3	Q63569	49 129	5,13	45,1	3,64	1	2	Lim. BBB
Class I histocompatibility antigen, GOGO-A0101 alpha chain	1A01_GORGO		P30375	40 804	5,91	191,1	6,57	2	2	Lim. BBB
Abhydrolase domain-containing protein 11	ABHDB_BOVIN	ABHD11	Q3SZ73	33 527	9,55	46,7	6	1	3	Lim. BBB
Serum albumin	ALBU_BOVIN	ALB	P02769	69 248	5,82	105,9	5,1	2	3	Lim. BBB
Beta-2-microglobulin	B2MG_BOVIN	B2M	P01888	13 668	7,79	114,8	21,18	2	3	Lim. BBB
Carbohydrate sulfotransferase 7	CHST7_RAT	Chst7	Q6XQG8	55 057	9,9	33,4	2,47	1	2	Lim. BBB
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	COX41_BOVIN	COX41I	P00423	19 559	9,32	32,5	7,1	1	2	Lim. BBB
Copine-6	CPNE6_BOVIN	CPNE6	Q95741	61 952	5,32	53,9	5,38	2	2	Lim. BBB
COP9 signalosome complex subunit 8	CSN8_RAT	Cops8	Q6P4Z9	23 221	5,09	52,1	17,22	2	2	Lim. BBB
Drebrin	DREB_RAT	DBN1	Q07266	77 424	4,46	66	6	2	3	Lim. BBB
Clathrin interactor 1	EPN4_BOVIN	CLINT1	A7Z035	70 477	6,15	49,1	1	1	3	Lim. BBB
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	GLYM_BOVIN	SHMT2	Q3SZ20	55 570	7,62	73	7,53	2	2	Lim. BBB
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRPR_HUMAN	HNRNP	Q43390	70 899	8,23	49,1	3,47	2	5	Lim. BBB
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDHP_BOVIN	IDH2	Q04467	50 707	8,88	51,6	4,86	2	3	Lim. BBB
Protein KIAA0284	K0284_MOUSE	Kiaa0284	Q80U49	170 718	6,42	34,8	2,7	2	2	Lim. BBB
UMP-CMP kinase	KCY_BOVIN	CMKP1	Q2KIW9	22 265	5,66	55,5	6,12	1	2	Lim. BBB
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7	LSM7_HUMAN	LSM7	Q9UK45	11 595	5,1	72,9	24,27	2	2	Lim. BBB
Microtubule-associated protein 4	MAP4_BOVIN	MAP4	P36225	111 846	4,85	73,7	2,14	1	2	Lim. BBB
Malignant fibrous histiocytoma-amplified sequence 1	MFHA1_HUMAN	MFHAS1	Q9Y4C4	116 838	8,02	40,8	2,7	2	2	Lim. BBB
Myoferlin	MYOF_HUMAN	MYOF	Q9NZM1	233 177	5,83	95,3	0,92	1	2	Lim. BBB
NHL repeat-containing protein 3	NHLC3_MOUSE	NHLRC3	Q8CCH2	38 171	5,81	47,8	3	1	2	Lim. BBB
Protein NipSnap homolog 2	NIPS2_HUMAN	GBAS	Q75323	33 721	9,42	53,9	6	1	2	Lim. BBB
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4HA2_MOUSE	P4HA2	Q60716	60 964	5,55	175,8	13,96	5	8	Lim. BBB
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	P5CS_HUMAN	ALDH18A1	P54886	87 248	6,66	47,2	1,5	1	3	Lim. BBB
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-B	PCATB_RAT	Aylt1b	Q4V8A1	58 526	8,71	45,2	3	2	2	Lim. BBB
Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4_BOVIN	PDIA4	Q29RV1	72 481	4,99	50	2,79	1	3	Lim. BBB
PDZ and LIM domain protein 5	PDLI5_RAT	PDLIM5	Q62920	63 161	8,73	48,9	1,86	1	3	Lim. BBB
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	PRPS1_BOVIN	PRPS2	Q2HJ58	34 812	6,51	91,5	2,7	1	2	Lim. BBB
26S protease regulatory subunit S10B	PRS10_BOVIN	PSMC6	Q2KIW6	44 046	6,74	42	5,4	2	2	Lim. BBB
Ras-related protein Rab-2A	RAB2A_RAT	RAB2A	P05712	23 521	6,08	31,2	6,13	1	2	Lim. BBB
RNA-binding protein Raly	RALY_MOUSE	RALY	Q64012	33 138	8,94	39,8	3,52	1	2	Lim. BBB
40S ribosomal protein S14	RS14_RAT	Rps14	P13471	16 249	10,07	96,2	14	1	2	Lim. BBB
Splicing factor 1	SF01_HUMAN	SF1	Q15637	68 286	9,07	67,4	5,55	1	2	Lim. BBB
Sideroflexin-3	SFXN3_BOVIN	SFXN3	A6QP55	35 685	9,66	81,2	9	2	3	Lim. BBB
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	SMD2_BOVIN	SNRPD2	Q3SZF8	13 518	9,92	78,8	16,1	1	2	Lim. BBB
Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	SYTC_MOUSE	TARS	Q3ZBV8	83 439	6,34	62,7	2,9	2	2	Lim. BBB
Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1	TGFA1_BOVIN	TGFBRAP1	Q8WUH2	97 096	6,1	36	2,7	2	2	Lim. BBB
Tax1-binding protein 3	TX1B3_MOUSE	TAX1BP3	Q9DBG9	13 714	8,04	104,5	14,51	1	2	Lim. BBB
Vigilin	VIGLN_RAT	HDLBP	Q9Z1A6	141 496	6,51	49,7	1,65	1	3	Lim. BBB

^a Score d'identification : la relevance des identités protéiques est jugée par le *probability-based molecular weight search score* (calculé avec $p < 0,05$). Le seuil de significativité des scores d'ions correspond à la valeur de 31.

^b Protéines identifiées dans les BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) ou co-cultivées (Re-ind. BBB).

La classification des 39 protéines spécifiques à la condition solo-culture selon les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées montre qu'environ 75 % d'entre elles sont impliquées dans les processus métaboliques (GO : 0008152 \approx 32,4 %), cellulaires (GO : 0009987 \approx 13,6 %) et développementaux (GO : 0032502 \approx 10,8 %), dans le transport (GO : 0006810 \approx 10,8 %), dans l'organisation des composants cellulaires (GO : 0016043 \approx 8,5 %) et la communication (GO : 0007154 \approx 4,5 %).

Une répartition similaire des 11 protéines spécifiques à la condition co-culture est retrouvée mais ne peut être comparée à la condition solo-culture en raison de leur faible nombre. Néanmoins, on y retrouve des protéines associées au cytosquelette, des protéines associées au transport vésiculaire, des protéines de liaison aux acides nucléiques et des protéines du métabolisme.

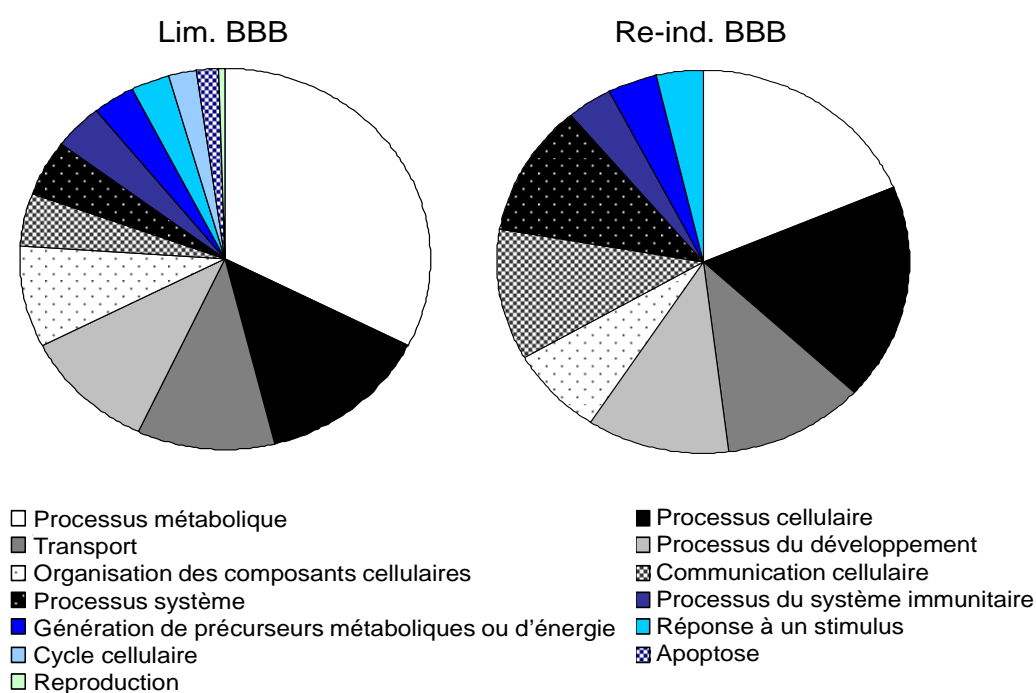


Figure 25 : Classification des protéines spécifiques aux deux conditions cellulaires (Lim. BBB, 39 protéines et Re-ind. BBB, 11 protéines) selon les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées.

Classification effectuée grâce au système de classification PANTHER.

2. Analyses biochimiques de deux protéines d'intérêt : la phosphatase alcaline tissu-non spécifique (TNAP) et la protéine 1 contenant un domaine d'homologie à Eps15 (EHD1)

Parmi les 11 protéines retrouvées spécifiquement dans les BCECs co-cultivées, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux d'entre-elles : la phosphatase alcaline (AP) tissu-non spécifique (TNAP) et la protéine 1 contenant un domaine d'homologie à Eps15 (EHD1). Nous avons centré nos recherches sur ces deux protéines de par leur implication dans le phénotype BHE (TNAP) et dans le transport vésiculaire (EHD1).

2.1. Immunocytochimie

Les immunomarquages des monocouches de BCECs solo ou co-cultivées en présence de cellules gliales ont été réalisés à l'aide des mêmes anticorps (anti-TNAP et anti-EHD1) que ceux utilisés lors des analyses par western blot (Figure 26) (Deracinois *et al.*, 2012). Les images enregistrées par microscopie à fluorescence montrent clairement que la TNAP présente une distribution punctiforme au niveau de toute la cellule. Cependant, cette technique de microscopie ne permet pas de discerner si la TNAP est localisée au niveau de la membrane plasmique ou diffuse dans le cytoplasme et si sa localisation au niveau du noyau est interne, externe, soluble ou membranaire. La distribution cellulaire de l'EHD1 est quant à elle plus diffuse et plus homogène dans la cellule à l'exception du noyau où elle n'est pas détectée. Dans les deux cas, seule l'utilisation de la microscopie confocale permettra de préciser la localisation cellulaire de ces deux protéines.

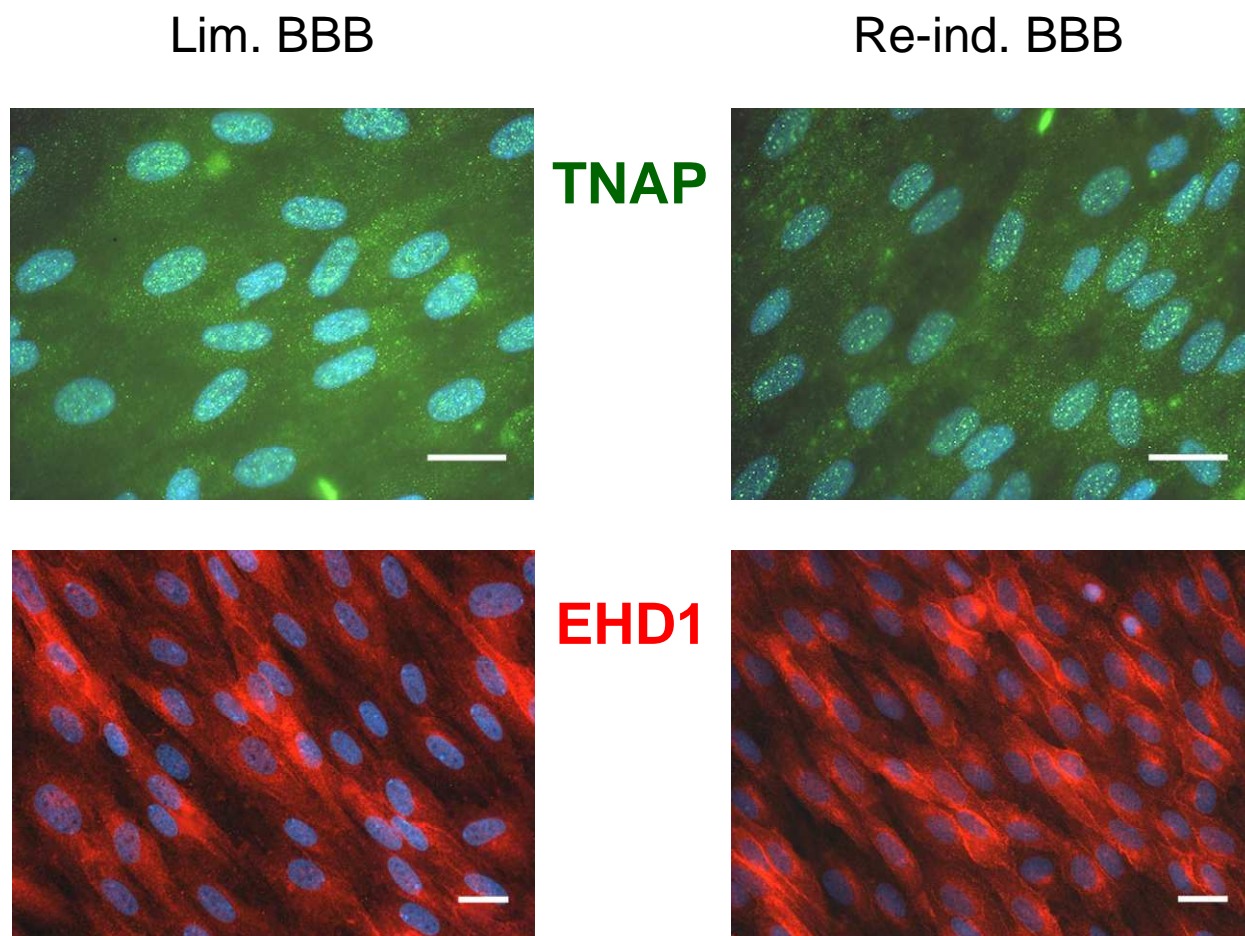


Figure 26 : Immunolocalisation des protéines TNAP et EHD1 au sein des BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) et co-cultivées (Re-ind. BBB).

Les immunomarquages sont réalisés après fixation des cellules par le paraformaldehyde à 4 % et perméabilisation des cellules grâce au Triton X-100 0,1 %. Les anticorps primaires anti-EHD1 et anti-TNAP sont utilisés au 1/100^e. La TNAP est visualisée en vert, l'EHD1 en rouge et les noyaux en bleu (marquage au Hoechst). La barre d'échelle correspond à 25 μ m. EHD1, protéine 1 contenant un domaine d'homologie à Eps15 ; TNAP, phosphatase alcaline tissu-non spécifique.

2.2. RT-PCR et western blot

La sur-expression de la TNAP et de l'EHD1 au sein des BCECs co-cultivées a ensuite été statistiquement évaluée, à partir de triplicat, à la fois sur le plan des transcrits (ARNm) par RT-PCR et sur le plan protéique par western blot. Les conditions d'amplification des ARNm, de même que les amorces utilisées, sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau V : Amorces et conditions utilisées pour l'amplification des ARNm.

ARNm	Espèces	Numéro d'accension	F/R	Séquence	Taille (bp)	Ta (C°)	Nombre de cycle
TNAP (<i>ALPL</i>)	<i>Bos taurus</i>	NM_176858.2	F	5'-gAAgTACATgTTCCCAAgA-3'	265	55	30
			R	5'-CTCAGAgAgTgAAgggTCAg-3'			
EHD1 (<i>EHD1</i>)	<i>Bos taurus</i>	NM_001015578.1	F	5'-TCAGCAGAgggTATgACTTT-3'	449	55	30
			R	5'-gAgggAgCTgATgATATACg-3'			
β -Actin (<i>ACTB</i>)	<i>Rattus</i>	NM_031144	F	5'-gAAgTACCCATTgAACACg-3'	177	55	25
			R	5'-ggTCTCAACATgATCTggg-3'			

De gauche à droite : ADNc cible pour l'amplification, espèces, numéro d'accension NCBI des ADNc, amorce sens (F) ou antisens (R), séquence des amorces 5' vers 3', taille en bp de la bande d'ADNc amplifiée, température d'hybridation (Ta) en °C et nombre de cycles utilisés pour amplifier les ADNc. EHD1, protéine 1 contenant un domaine d'homologie à Eps15 ; TNAP, phosphatase alcaline tissu-non spécifique.

Les analyses statistiques des résultats obtenus par RT-PCR (Figure 27 A) montrent que l'expression des transcrits de la TNAP (*ALPL*) et de l'EHD1 (*EHD1*) est en moyenne respectivement 2,13 et 1,35 fois plus élevée au sein des BCECs co-cultivées en comparaison aux cellules solo-cultivées. Les analyses statistiques des images des films autoradiographiques obtenus par western blot (Figure 27 B) montrent quant à elles que l'expression des protéines TNAP (*ALPL*) et EHD1 (*EHD1*) suit la même tendance (bien que les facteurs multiplicateurs ne soient pas les mêmes), avec respectivement une expression 18.7 fois et 1.54 fois plus élevée au sein des BCECs co-cultivées en comparaison aux BCECs solo-cultivées. Ces résultats sont l'illustration même que les variations d'expression des transcrits ne peuvent pas être directement corrélées aux variations quantitatives de l'expression des protéines proprement dites. En ce qui concerne les enzymes, il est de plus impératif de mesurer leurs activités en raison des nombreux facteurs qui les influencent (inhibiteurs, allostérie, phosphorylation, etc.).

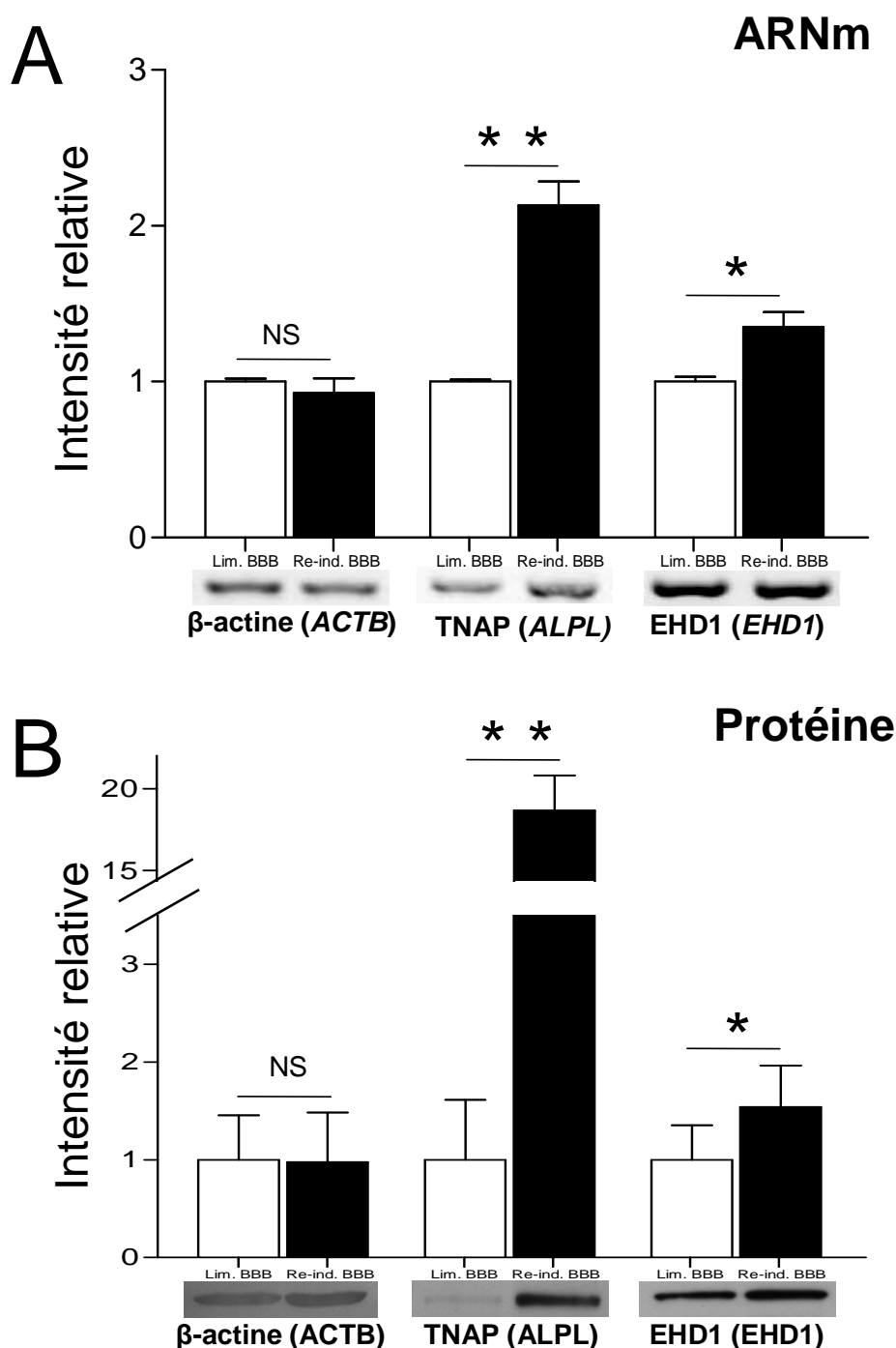


Figure 27 : Validations biochimiques de la sur-expression de la TNAP et de l'EHD1 dans les BCECs co-cultivées.

Analyses (A) par RT-PCR de l'expression des ARNm et (B) par western blot du taux protéique de β -actine, TNAP et EHD1 dans les BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) ou co-cultivées (Re-ind. BBB). Les analyses quantitatives et statistiques ont été réalisées avec respectivement les logiciels Quantity One (RT-PCR) ou TotalLab 100 (western blots) et PRISM 5. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM des analyses effectuées sur trois lots cellulaires différents. * $p < 0,03$; ** $p < 0,002$; NS : non significatif (*unpaired t-test* pour les analyses en RT-PCR et *paired t-test* pour les analyses en western blot). L'expression de la β -actine a été utilisée comme contrôle qualité des échantillons. EHD1, protéine 1 contenant un domaine d'homologie à Eps15 ; TNAP et ALPL, phosphatase alcaline tissu-non spécifique.

2.3. Activité enzymatique de l'AP et inhibition de la TNAP par le levamisole

L'activité cellulaire de l'AP, mesurée grâce à un kit de dosage (Figure 28 A, contrôle), est nettement augmentée (3.5 fois plus élevée) au sein des BCECs co-cultivées comparativement aux BCECs solo-cultivées.

L'influence de l'inhibition de l'activité de la TNAP sur la monocouche de BCECs a été étudiée par mesure de la perméabilité endothéliale au LY (Figure 28 B) et par immunocytochimie de la vimentine et de la ZO-1 (Figure 29). Pour ce faire, nous avons inhibé la TNAP par incubation des cellules pendant 4h avec différentes concentrations d'un inhibiteur incompétitif de cette enzyme, le levamisole.

Le dosage de l'activité de l'AP révèle une inhibition dose-dépendante des concentrations de levamisole (Figure 28 A). L'inhibition atteint 95 % et 86 % respectivement pour les BCECs solo-cultivées et co-cultivées pour une concentration de 5 mM de levamisole. La perméabilité endothéliale n'est pas affectée par la présence de levamisole mis à part pour la condition solo-culture à 5 mM (où la détection de l'activité enzymatique est quasiment-nulle) (Figure 28 B). Dans cette condition la perméabilité pour le LY augmente significativement de $0,772 \times 10^{-3} \text{ cm.min}^{-1}$ ($\pm 0,032$) pour la condition contrôle à $3,106 \times 10^{-3} \text{ cm.min}^{-1}$ ($\pm 0,227$) suggérant une perte d'intégrité de la monocouche. Le dosage de la cytotoxicité du levamisole vis-à-vis des cellules a été effectué en mesurant la libération de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture (Figure 28 C). Ce dosage montre que même pour les concentrations les plus élevées de levamisole, la mort cellulaire n'est pas significativement augmentée. En d'autres termes, aux concentrations utilisées, le levamisole n'est pas toxique pour les cellules.

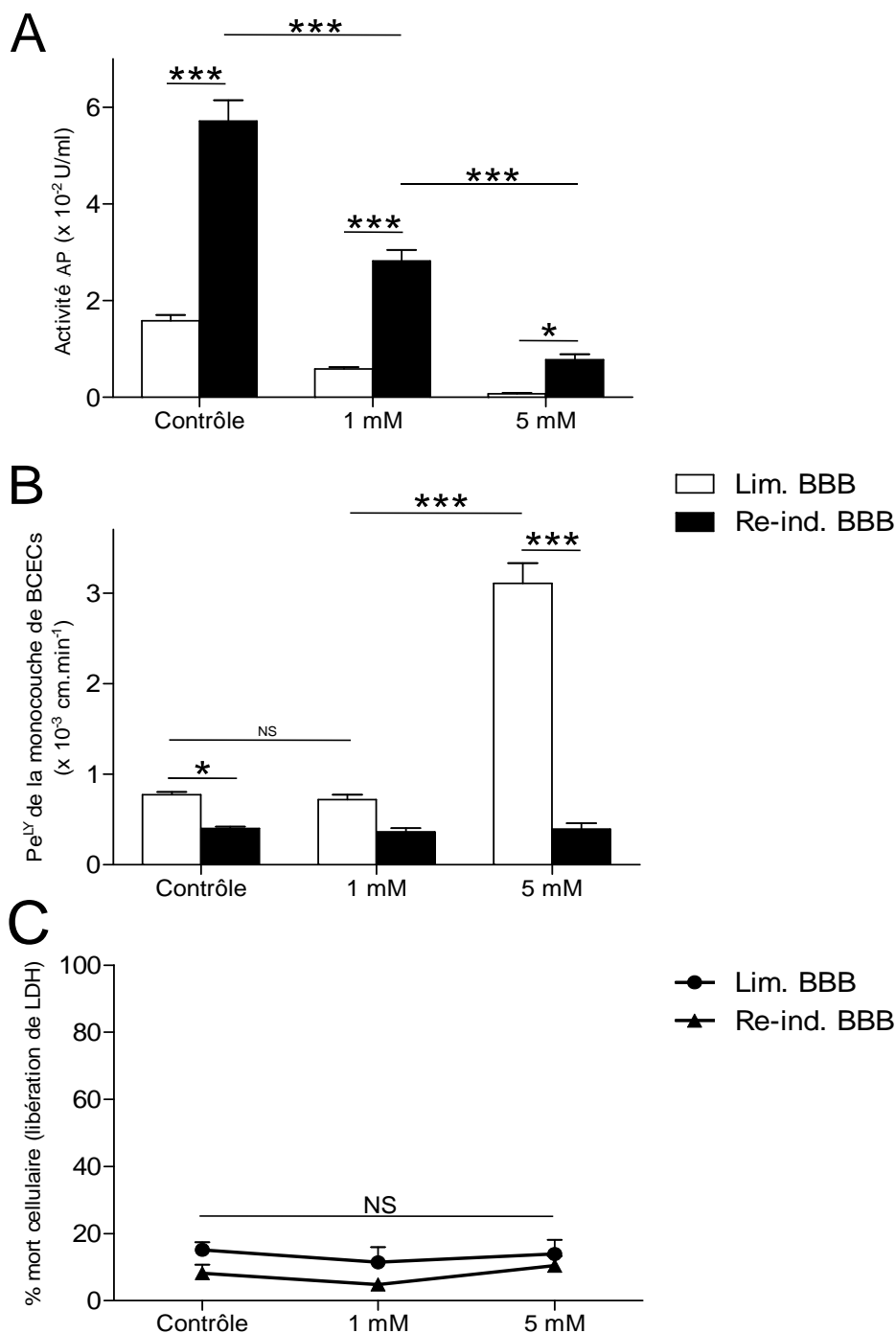


Figure 28 : Dosage et inhibition médiée par le levamisole de l'activité enzymatique de l'AP au sein des BCECs.

(A) Activité enzymatique de l'AP au sein des BCECs, (B) perméabilité de la monocouche de BCECs vis-à-vis du jaune lucifer (Pe^{LY}) et (C) pourcentage de mort cellulaire endothéliale (par dosage de l'activité de la LDH libérée dans le milieu de culture) : déterminés après 4h d'incubation des BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) ou co-cultivées (Re-ind. BBB) avec différentes concentrations de levamisole (0 à 5 mM). L'étendue de la mort cellulaire dans chaque condition expérimentale est exprimée par rapport à la condition 100 % de mort cellulaire (où les cellules sont lysées à l'aide d'un tampon contenant 9 % de Triton X-100 (w/v)). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel PRISM 5. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM (N = 3, n = 9 monocouches de BCECs par traitement). La significativité entre les conditions a été testée par une analyse de la variance à deux facteurs suivie d'un test *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. AP, phosphatase alcaline ; LDH, lactate déshydrogénase ; NS : non significatif.

Les marquages immunocytochimiques de la vimentine et de la ZO-1 montrent une perturbation de la monocouche de BCECs dépendante de la concentration en levamisole, notamment en solo-culture (Figure 29). Dans les conditions contrôle (0 mM) la monocouche de BCECs solo-cultivées est moins régulière qu'en co-culture. Les cellules semblent plus volumineuses. La forme des cellules co-cultivées ne semble pas être affectée par des concentrations élevées en levamisole (1 et 5 mM) alors que solo-cultivées, les BCECs ont tendance à se rétracter et à se dissocier les unes des autres (flèches blanches). Cette dissociation est responsable d'une perte d'intégrité de la monocouche et donc de l'augmentation de la perméabilité au LY. Ce marquage cellulaire de la vimentine révèle, pour les deux conditions cellulaires, une modification de l'organisation du cytosquelette ainsi qu'une déformation des noyaux en réponse au levamisole. Pour les mêmes concentrations en levamisole, cette réorganisation est d'autant plus marquée en solo-culture contrairement à la co-culture.

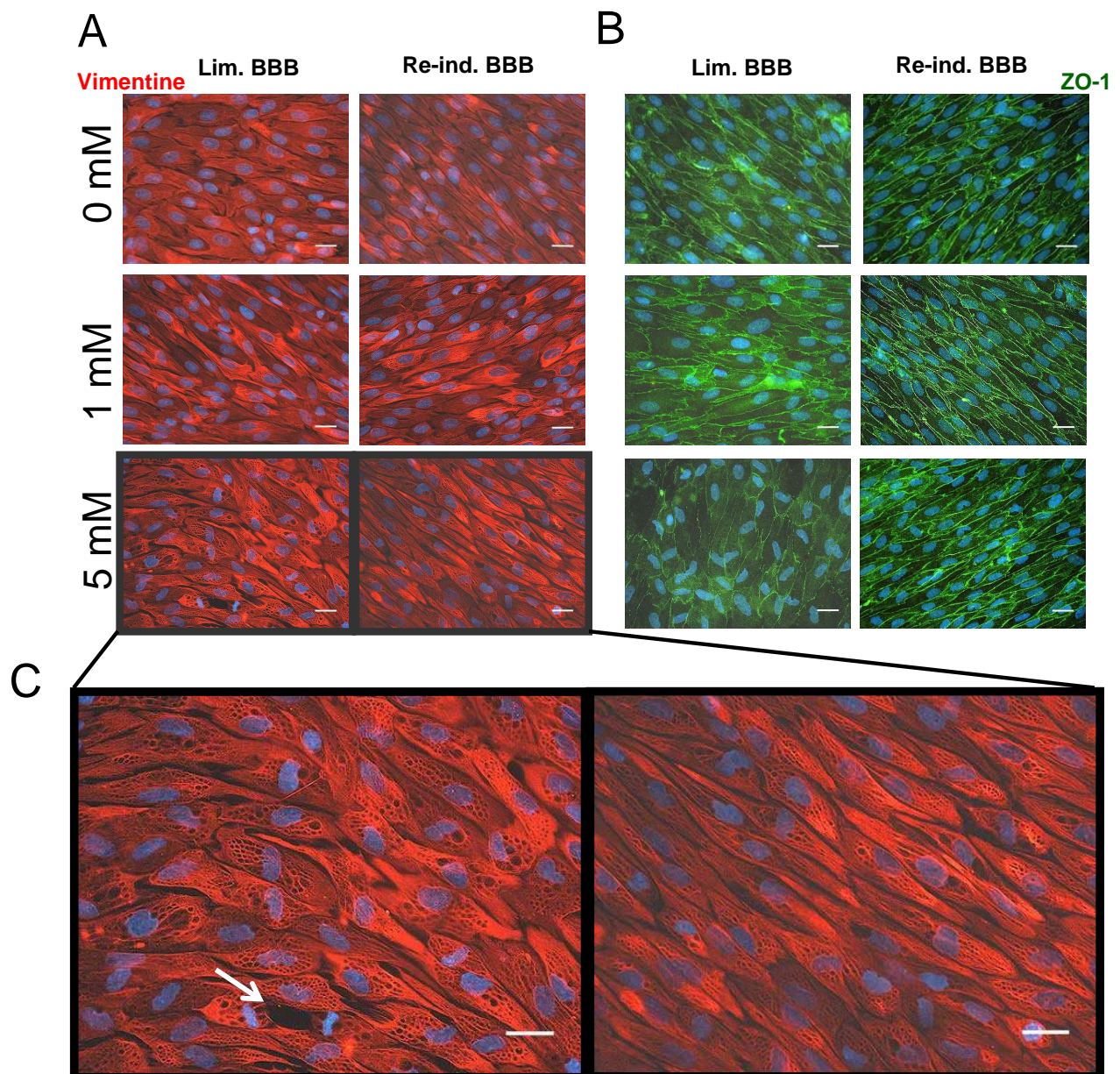


Figure 29 : Effets du levamisole sur la monocouche de BCECs.

Marquage immunocytochimique de la vimentine (filament intermédiaire) (panneaux A et C) et de la zonula occludens (ZO-1, protéine associée aux jonctions serrées) (panneau B) au sein des BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) ou co-cultivées (Re-ind. BBB) après 4h d'incubation avec différentes concentrations de levamisole (0, 1 et 5 mM). La flèche blanche souligne la perte d'intégrité (apparition d'un espace intercellulaire) au sein de la monocouche des BCECs solo-cultivées incubées avec 5 mM de levamisole (panneau C). Les immunomarquages sont réalisés après fixation des cellules par le paraformaldehyde à 4 % et après perméabilisation des cellules à la saponine 0,1 % pour la vimentine et au Triton X-100 0,1 % pour la ZO-1. Les anticorps primaires anti-vimentine et anti-ZO-1 sont utilisés respectivement au 1/50^e et au 1/200^e. La vimentine est visualisée en rouge, la ZO-1 en vert et les noyaux en bleu (marquage au Hoechst). La barre d'échelle correspond à 25 µm.

3. Discussion

3.1. Extraction des protéines solubles dans le Triton X-100

L'objectif de notre étude qui est de comparer les protéines cytoplasmiques issues des BCECs solo-cultivées et co-cultivées, a nécessité l'utilisation d'un moyen d'extraction adapté à ce type de protéines. Notre choix s'est porté sur leur extraction à l'aide d'un tampon contenant 1 % de Triton X-100. Ce détergent non ionique et non dénaturant présente un double intérêt : (i) il favorise la lyse cellulaire par son effet perméabilisant et (ii) il favorise la solubilisation des protéines. Il va néanmoins limiter la solubilisation de nombreuses protéines membranaires et de certaines protéines associées à la membrane et notamment celles impliquées dans le maillage du cytosquelette en périphérie des cellules (squelette cortical de la cellule). Des protéines de la membrane plasmique seront tout de même solubilisées. Il est donc plus juste de parler de fraction de protéines solubles dans le Triton X-100 plutôt que de fraction de protéines cytoplasmiques. Néanmoins, l'extraction des protéines au Triton X-100 nous permet d'identifier préférentiellement des protéines cytoplasmiques (plus de 80 % des protéines identifiées).

Les premiers travaux protéomiques effectués sur ces extraits ont été réalisés au laboratoire par 2D-PAGE (Pottiez *et al.*, 2009; Pottiez *et al.*, 2010b; Pottiez *et al.*, 2011). Ils ont clairement mis en évidence les limites analytiques de cette approche, les propriétés physico-chimiques extrêmes des protéines en étant responsables. Afin de pallier ces limites, nous avons développé une approche basée sur l'analyse par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS du même type d'extraits, préalablement fractionnés pour en réduire l'hétérogénéité protéique.

L'analyse des données issues des nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS de chaque fraction atteste de la comparabilité des échantillons. En effet, quelle que soit la fraction considérée, le nombre de composés détectés, de MS/MS programmées et de protéines identifiées sont non significativement différents. Les fractions F100 et FCA sont, quant à elles, inutiles à notre étude puisqu'elles ne renferment que les protéines majoritaires du cytosol (actine, vimentine, etc.). L'analyse des identifications protéiques spécifiques à une fraction donnée montre clairement une composition protéique différente entre la fraction F0 et les autres fractions. Les résultats des séparations nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS peuvent être visualisés sous forme dite « de gel » grâce à des cartes peptidiques bidimensionnelles représentant les différents spectres de masse selon leur temps d'élution. La seule vue générale détaillée de ces cartes témoigne de nouveau de l'homogénéité des résultats.

3.2. Avantages et inconvénients des analyses chromatographiques

L'étude des propriétés physico-chimiques des 447 protéines identifiées révèle que l'analyse nano-LC MALDI TOF/TOF-MS a permis l'identification de protéines de MM élevée

(supérieure à 150 kDa) dont la filamine (280 kDa), la nestine (177 kDa) et la spectrine (285 kDa) ; de MM faible (inférieure à 15 kDa) dont l'ATP synthase (10 kDa) ou encore certaines histones et protéines ribosomales ; de pI élevé (supérieur à 11) dont principalement des facteurs d'épissage et certaines histones et protéines ribosomales ; et pour finir de pI faible dont la calmoduline (3,7), la nestine (4,2) et la nucléophosmine (4,5). Toutes ces identifications démontrent bien l'intérêt des analyses chromatographiques en comparaison aux analyses électrophorétiques où ces protéines sont souvent exclues du gel.

Il faut cependant noter que ces analyses chromatographiques fournissent un pourcentage assez élevé de protéines identifiées avec un seul peptide en raison d'un nombre considérable de peptides générés. Ce phénomène est un inconvénient majeur des stratégies d'analyse directe (*shotgun*) de mélanges complexes de peptides. Ce problème est d'autant plus grand pour les protéines possédant de fortes homologues de séquences avec d'autres protéines (telles que les isoformes) (Nesvizhskii and Aebersold, 2005). Afin de ne pas perdre l'information biologique que constitue leur identification, ces protéines peuvent être prises en considération lors du traitement des données mais doivent néanmoins être soumises à des validations (vérification de la qualité spectrale de la fragmentation du peptide, méthodes biochimiques).

De plus, l'hétérogénéité structurale des protéines (isoformes, MPTs) observée en gel d'électrophorèse bidimensionnelle se voit totalement gommée lors d'une approche nano-LC MS/MS, ce qui constitue le plus important désavantage de ce type de stratégie.

3.3. Identifications protéiques

Les résultats globaux de masse montrent qu'uniquement 50 % des peptides fragmentés sont identifiés de manière significative comme appartenant à une protéine présente dans les bases de données, en raison, une nouvelle fois, d'une trop grande hétérogénéité peptidique en dépit de notre fractionnement. Malgré ce faible pourcentage, 150 à 200 protéines sont tout de même identifiées pour chaque fraction. L'analyse globale des fractions F0, F25, F50 et F75 permet de mettre en évidence un total de 447 protéines dont 90 % sont communes entre les deux conditions. Le phénotype protéique des BCECs solo-cultivées et co-cultivées « diffère » ainsi de 10 % (ce pourcentage est basé uniquement sur les identifications de cette étude). Ces 10 % correspondent à 50 protéines retrouvées spécifiquement dans une des deux conditions cellulaires. La stratégie protéomique établie ici ne permet pas de conclure que ces protéines dites « spécifiques » présentent une abondance distincte entre les deux conditions cellulaires. En effet, notre approche ne se base pas sur une méthode de quantification mais uniquement sur une comparaison qualitative de liste de protéines. Une protéine non identifiée dans une condition n'est pas pour autant totalement absente de l'échantillon. Les peptides issus de cette protéine peuvent tout simplement ne pas avoir été détectés par le spectromètre de masse en

raison d'une trop faible quantité, en raison de la variabilité technique engendrant des phénomènes de suppression de masse si le ou les peptides sont élués en même temps que d'autres peptides de rapport de m/z voisin ou encore en raison d'un spectre de fragmentation de mauvaise qualité ne pouvant aboutir à une identification. Cependant, la part de la variabilité technique peut être minimisée par la répétition des analyses. Dans tous les cas, avant de conclure à une différence de quantité d'une protéine donnée entre les deux conditions cellulaires, des vérifications par des techniques biochimiques sont nécessaires. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux protéines parmi celles identifiées spécifiquement au sein des BCECs co-cultivées.

La protéine TNAP

L'AP est une enzyme ubiquitaire dimérique (EC 3.1.3.1) liée à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Elle catalyse l'hydrolyse des phosphomonoesters en libérant un phosphate inorganique et un alcool à partir d'un grand nombre de substrats. Cette activité de déphosphorylation s'exerce sur des nucléotides extracellulaires mono- di- ou triphosphates (tels que l'ATP) (activité ectonucléotidase) et des molécules inflammatoires (telles que les lipopolysaccharides) (détoxication) (Bates *et al.*, 2007; Bentala *et al.*, 2002; Poelstra *et al.*, 1997; Rezende *et al.*, 1994) mais cette activité déphosphorylante vis-à-vis de protéines phosphorylées reste controversée.

Quatre isoenzymes sont classées selon leur spécificité tissulaire : l'AP intestinale, l'AP placentaire, l'AP des cellules germinales et la TNAP (type foie, os et rein) (Van Hoof and De Broe, 1994). La présence d'une activité AP dans le cerveau au sein des BCECs a été reportée il y a plusieurs années (Meunier and Bouchaud, 1978). L'isoforme retrouvé est la tissu-non spécifique : la TNAP (Langer *et al.*, 2008). Cette enzyme est considérée comme un marqueur du phénotype de BHE car induite par son environnement (Beck *et al.*, 1986). De nombreux substrats sont capables de moduler son expression : l'acide rétinoïque, l'AMPc, les glucocorticoïdes, le *transforming growth factor β* , l'interleukine 6 ou encore le *basic fibroblast growth factor* (Adams and Melnykovich, 1985; Beuckmann *et al.*, 1995; Nakazato *et al.*, 1997; Sobue *et al.*, 1999).

La TNAP est surtout connue pour son rôle dans les mécanismes de minéralisation et de remodelage de l'os où sa déficience génétique est responsable de très graves troubles des processus d'ossification répertoriés sous le terme médical d'hypophosphatasie (Whyte, 2010). Elle fait aussi l'objet de nombreuses études comme protéine d'intérêt pour la réduction de la réponse inflammatoire par exemple en réponse à un acte chirurgical (Kats, 2011). Son rôle semble être important au niveau cérébral : des cas d'hyperphosphatasie sont retrouvés associés à des désordres neurologiques comme des retards mentaux (Mabry *et al.*, 1970). La baisse d'activité de détoxication de la TNAP vis-à-vis de molécules inflammatoires pourrait être

liée à ces désordres neurologiques (Oby and Janigro, 2006). Elle est aussi impliquée dans le métabolisme des neurotransmetteurs (Balasubramaniam *et al.*, 2010). La TNAP pourrait réguler la concentration extracellulaire cérébrale de pyridoxal-5'-phosphate (PLP) *via* sa déphosphorylation au niveau des BCECs permettant à la pyridoxine (forme déphosphorylée de PLP) de traverser la BHE (Yarlagadda and Clayton, 2007). Une déficience alimentaire en vitamine B6, précurseur de PLP (tel que la pyridoxine), est responsable de crises d'épilepsie (Waymire *et al.*, 1995). Ce co-facteur est impliqué dans différentes réactions (comme la décarboxylation d'acides aminés) et dans la production de plusieurs molécules (des neurotransmetteurs aux polyamines) (Di Salvo *et al.*, 2011).

Il a été récemment rapporté que la TNAP favorise la croissance axonale des neurones hippocampiques en régulant (*via* son activité ectonucléotidase) la concentration extracellulaire d'ATP (Díez-Zaera *et al.*, 2011). *In vitro*, elle favorise l'effet neurotoxique de la protéine extracellulaire tau (Díaz-Hernández *et al.*, 2010). *In vivo*, cette activité TNAP est élevée dans l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Vardy *et al.*, 2012). Puisque la TNAP semble en partie conditionner la ré-induction du phénotype BHE des BCECs, on peut supposer que la réduction de la perméabilité de la BHE peut favoriser les lésions cérébrales médiées par tau en réduisant la clairance cérébrale de cette protéine. Cette hypothèse reste néanmoins à confirmer.

Nous confirmons *via* notre étude que l'expression de cette enzyme ainsi que son activité sont nettement augmentées au sein des BCECs co-cultivées en présence de cellules gliales en comparaison aux BCECs solo-cultivées. Nous apportons pour la première fois une identification de la TNAP au sein des BCECs par une approche protéomique. Nous montrons également que les cellules gliales induisent un effet protecteur sur les BCECs vis-à-vis du levamisole, inhibiteur de la TNAP. Le levamisole engendre une souffrance des BCECs caractérisée par une réorganisation du cytosquelette et notamment de la vimentine ainsi que la rétraction des cellules. Sans expériences complémentaires, il nous est difficile de décrire ce phénomène. Les formes circulaires non marquées pour la vimentine ainsi que la déformation du noyau des cellules nous pousse à penser à une formation anormale de vésicules à l'intérieur de la cellule. Afin de valider cette hypothèse, une caractérisation de ces vésicules est nécessaire. Ces contraintes cytoplasmiques semblent être dépendantes de l'activité enzymatique de la TNAP plutôt qu'un effet toxique direct du levamisole. En effet, plus l'activité de la TNAP est faible, plus ces contraintes sont importantes. La rétraction des CE et donc la perte d'intégrité de la monocouche intervient lorsque cette activité est quasi-nulle. Des études complémentaires avec des concentrations plus élevées de levamisole, des temps d'incubation différents mais aussi une étude sur la réversibilité de ce phénomène sont envisagées afin de mieux caractériser l'effet du levamisole sur les BCECs.

La localisation de la TNAP par immunocytochimie est ambiguë mais devrait être résolue par des analyses en microscopie confocale. Elle semble être néanmoins retrouvée à l'intérieur de la cellule nous permettant de supposer un second rôle de la TNAP (autre que celui de détoxification) dans la déphosphorylation et donc dans la régulation de nombreuses protéines (telles que les protéines des jonctions serrées ou encore les transporteurs ou récepteurs) (Calhau *et al.*, 2002a; Calhau *et al.*, 2002b). Une étude protéomique différentielle sur les phosphoprotéines des BCECs solo-cultivées et co-cultivées (en présence ou non de levamisole) pourrait nous apporter des informations sur le rôle de la TNAP au sein des BCECs ainsi que son implication au niveau du phénotype BHE.

La protéine EHD1

Dans cette étude, nous avons mis en évidence l'expression différentielle de l'EHD1 aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. Cette protéine est induite au sein des BCECs par la présence des cellules gliales. L'EHD1 est le membre le plus étudié de la famille des protéines contenant un domaine d'homologie à Eps15. Elle co-contrôle le recyclage des endosomes et le transport des récepteurs internalisés *via* la voie d'endocytose dépendante ou indépendante de la clathrine (Kieken *et al.*, 2007; Naslavsky and Caplan, 2005). Plus spécifiquement, l'EHD1 est une sérine phosphoprotéine inductible par le sérum (Fichtman *et al.*, 2008) trouvée dans les compartiments de recyclage des endosomes (Mintz *et al.*, 1999). Elle régule la sortie d'un large éventail de protéines (dont le récepteur de la transferrine, TfR ; l'intégrine $\beta 1$ et le transporteur du glucose de type 4, Glut4) des compartiments cellulaires vers la membrane plasmique. Le TfR, récepteur cible très étudié pour l'adressage des médicaments au cerveau (Jones and Shusta, 2007), est spécifiquement exprimé sur la face luminale des BCECs (Jefferies *et al.*, 1984) et son taux est augmenté en co-culture avec les cellules gliales (Hayashi *et al.*, 1997). Les astrocytes et les oligodendrocytes manquent de TfR, ils pourraient alors influencer le transport du fer par les BCECs. La synthèse du TfR est régulée par les taux d'ARNm par 5 éléments de réponse au fer présents dans les régions non traduites de l'ARNm, conduisant à la sur-expression du TfR lors de situation de déplétion en fer. Cependant, de faible taux extracellulaire de fer ne suscite pas une grande expression de TfR dans les BCECs, malgré un transport du fer élevé (Taylor *et al.*, 1991). Ceci suggère que la déplétion en fer engendre un recyclage des endosomes contenant le TfR. Bien que la nature du transport du fer au travers des BCECs soit sujet à débat il est clair que celui-ci est transporté du sang vers le cerveau et que ce transport commence par l'endocytose du complexe fer-lactoferrine-TfR (par la suite le TfR est recyclé à la membrane plasmique). Ainsi la sur-expression de l'EHD1 dans les BCECs co-cultivées peut contribuer à l'évidence indirecte du recyclage rapide du TfR. Le transporteur du glucose de type 4 et l'intégrine $\beta 1$ étant également exprimés par l'endothélium de BHE, il est

possible de suggérer un mécanisme similaire entre ces protéines et l'EHD1 (Cayrol *et al.*, 2011; Ngarmukos *et al.*, 2001).

L'EHD1 est connue pour se lier directement à une variété de phospholipides (Jović *et al.*, 2009; Naslavsky *et al.*, 2007a) et réguler l'homéostasie du cholestérol, suggérant son implication dans l'internalisation des récepteurs des LDLs (tels que *LDL-receptor related protein 1*, LRP1) (Naslavsky *et al.*, 2007b). L'endocytose médiée par LRP1 a aussi été mentionnée comme connectée avec l'internalisation de nombreuses molécules dans l'endothélium de la BHE. L'EHD1 régule également la dynamique de l'actine en interagissant avec, par exemple, les GTPases Rac1 et CDC42 (*cell division control protein 42 homolog*), membres de la famille de Rho (Ikeda *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1997). Des changements quantitatifs du taux de protéines liées à l'actine dans les BCECs co-cultivées avaient déjà été décrits (Pottiez *et al.*, 2009; Pottiez *et al.*, 2011).

La méthode de fractionnement organique des protéines (Pottiez *et al.*, 2010b) est utilisée ici pour la première fois dans l'optique d'une analyse protéomique différentielle des protéines, solubilisées en Triton X-100, extraites des BCECs solo-cultivées et co-cultivées. Ce fractionnement est reproductible et permet une simplification des extraits protéiques nécessaires pour une analyse nano-LC couplée à un spectromètre de masse de type MALDI-TOF/TOF-MS. Cette simplification des échantillons nous a permis d'augmenter considérablement le nombre de protéines identifiées. Parmi elles, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la TNAP et à l'EHD1. Leur abondance présumée dans les BCECs co-cultivées en présence de cellules gliales a été confirmée par RT-PCR et western blot et montre donc une induction de l'expression de ces deux protéines par les cellules gliales. De même, l'activité enzymatique de la TNAP a été retrouvée nettement plus augmentée au sein des BCECs co-cultivées en comparaison aux mêmes cellules solo-cultivées.

La sur-expression de l'EHD1 suggère que le recyclage des endosomes et le transport sont probablement accélérés dans les BCECs possédant un phénotype de barrière. Ce phénomène de recyclage à la membrane accéléré des endosomes, peut être lié à l'efflux des médicaments (combinés ou non à un vecteur cible d'un récepteur spécifique) vers le sang et donc au problème d'acheminement de ces derniers vers le cerveau. L'implication de l'EHD1 dans cet hypothétique efflux doit être étudiée.

Nous démontrons ici que l'induction médiée par les cellules gliales de la TNAP prévient l'augmentation de la perméabilité induite par le levamisole, inhibiteur incompétitif de la TNAP. Ces travaux suggèrent que cette enzyme peut être un acteur clef dans l'établissement et le maintien du phénotype de BHE dans les BCECs. Cependant, la nature des actions de la TNAP (ectonucléotidase ou activité phosphatase) et le mécanisme soulignant l'implication de l'enzyme dans le processus d'induction des cellules gliales restent à déterminer.

Annexe 1 : Communication affichée

Étude protéomique différentielle *label free* par nano-LC MS/MS pour une meilleure compréhension du phénotype barrière hémato-encéphalique.

Deracinois B, Duban-Deweere S, Hachani J, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y.

Réunion annuelle de la Société d'Etude des Interfaces "Sang-Cerveau" (S.E.I.S.C.),

31 mai 2010, Paris, France.

Etude protéomique différentielle « label free » par nano-LC MS/MS pour une meilleure compréhension du phénotype barrière hémato-encéphalique.



DERACINOIS Barbara, DUBAN-DEWEER Sophie, HACHANI Johan, CECHELLI Roméo, FLAHAUT Christophe, KARAMANOS Yannis ξ,
ξ Laboratoire de physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique, EA 2465, IMPRT-IRF 114, Université d'Artois, 62307 LENS, France.



Introduction

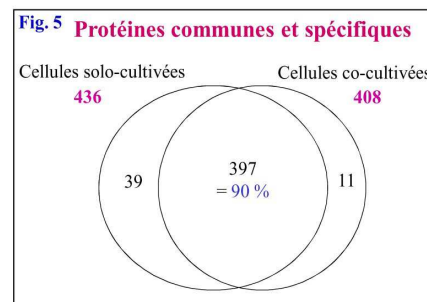
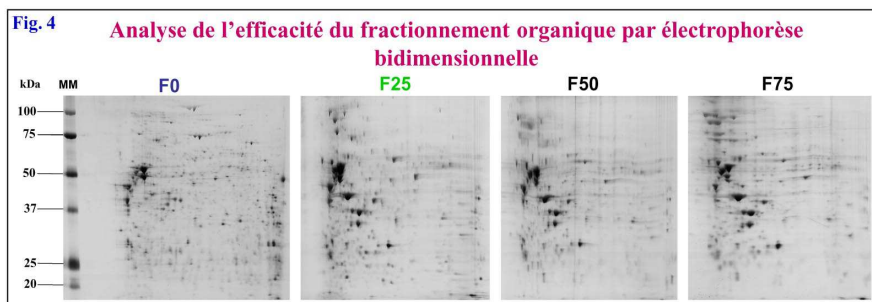
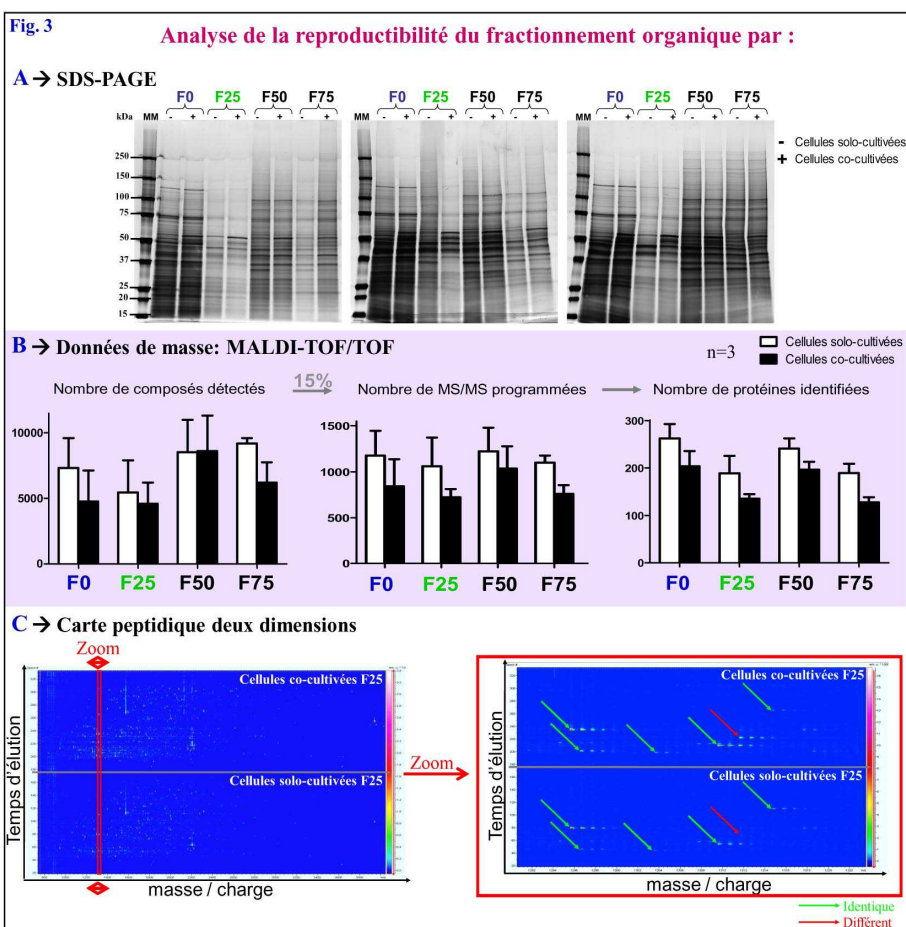
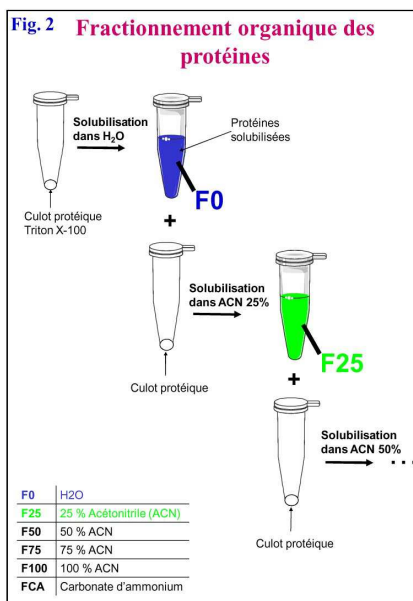
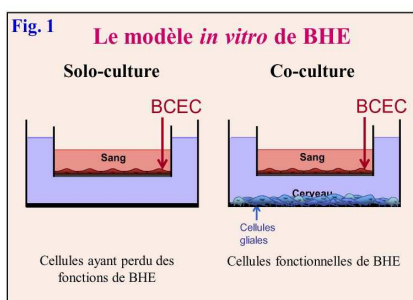
95 % des composés thérapeutiques à visée cérébrale sont inefficaces *in vivo* du fait de la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qu'ils sont incapables de franchir. Le phénotype BHE est bien caractérisé au niveau membranaire en ce qui concerne les protéines des jonctions serrées, responsables de la faible perméabilité paracellulaire, les récepteurs et transporteurs spécifiques régulant le passage transcellulaire et également les protéines d'efflux moléculaires, destinées à réexpédier vers la circulation sanguine certaines molécules exogènes. Cependant, peu de données sont encore établies au niveau cytosolique. Ainsi, à partir d'un modèle *in vitro* de BHE, une étude protéomique différentielle label free par nano-chromatographie liquide « couplée » à la spectrométrie de masse (nano-LC MS/MS) du protéome cytosolique de cellules endothéliales (CE) cérébrales, ayant perdu ou non des fonctions de BHE, a été effectuée, dans le but de détecter et d'identifier les protéines cytosoliques impliquées dans l'établissement et le maintien du phénotype BHE.

Matériel et méthodes

Les CE de capillaires cérébraux (BCEC) ayant perdu des fonctions de BHE (solo-culture) ou non (co-culture avec astrocytes) sont obtenues grâce à un modèle différencié de co-culture (Fig. 1). Le phénotype BHE est vérifié par la mesure de la perméabilité de l'endothélium et par immunocytochimie des protéines des jonctions serrées (données non montrées). Les CE sont collectées par traitement à la collagénase et lysées par un tampon contenant 1% de Triton X-100. Les protéines extraites par le Triton X-100 sont alors soumises à un fractionnement organique. Chaque fraction est ensuite analysée par nano-LC MS/MS, après digestion trypsique, puis comparées entre elles.

Résultats et conclusion

En raison de l'hétérogénéité du pool de protéines solubles dans le Triton X-100, les échantillons (solo-culture ou co-culture) sous soumis à un fractionnement basé sur l'hydrophobie des protéines à l'aide d'un gradient discontinu d'acétonitrile (Fig. 2). Dans ce poster, nous démontrons la reproductibilité du fractionnement protéique utilisé pour cette étude (i) par analyse SDS-PAGE (Fig. 3 A), (ii) grâce aux données obtenues en spectrométrie de masse (Fig. 3 B), (iii) grâce aux cartes peptidiques deux dimensions (Fig. 3 C), ainsi que son efficacité (iv) par analyse 2D-PAGE (Fig. 4). L'analyse nano-LC MS/MS de chacune des fractions permet l'identification de 408 et 436 protéines distinctes pour respectivement les CE co-cultivées ou non (Fig. 5). Comparativement, 11 protéines semblent plus abondamment retrouvées au sein du cytosol des CE co-cultivées, contre 39 protéines pour les CE solo-cultivées.



Perspectives

Par cette stratégie sans marquage préalable des protéines, seules les fortes variations quantitatives sont détectées. Dès lors, afin d'estimer plus finement ces variations engendrées par la réduction des fonctions de BHE, ces expérimentations seront très prochainement réitérées (i) sur un spectromètre de masse plus performant, (ii) avec marquage isotopique préalable des protéines (les protéines sont marquées sur leurs fonctions amines libres par des réactifs traceurs composés de 6 atomes de ^{12}C (léger) ou 6 atomes de ^{13}C (lourd). La quantification relative repose alors sur la recherche et la comparaison quantitative de signaux de masse distants de 6, 12 ou 18 unités de masse atomique). De même, il nous faudra utiliser les techniques de western blot et de biologie moléculaire pour confirmer ou infirmer aux niveaux transcriptionnel et traductionnel ces variations quantitatives.

Annexe 2 : Publication

TNAP and EHD1 are over-expressed in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties.

Deracinois B, Duban-Deweert S, Pottiez G, Cecchelli R, Karamanos Y, Flahaut C. (2012),
PLoS one, 7(10) : e48428.

TNAP and EHD1 Are Over-Expressed in Bovine Brain Capillary Endothelial Cells after the Re-Induction of Blood-Brain Barrier Properties

Barbara Deracinois^{1,2,3}, Sophie Duban-Deweier^{1,2,3}, Gwënaél Pottiez^{1,2,3}, Roméo Cecchelli^{1,2,3}, Yannis Karamanos^{1,2,3}, Christophe Flahaut^{1,2,3*}

1 Université Lille Nord de France, Lille, France, **2** Université d'Artois, LBHE, Lens, France, **3** IMPRT-IFR114, Lille, France

Abstract

Although the physiological properties of the blood-brain barrier (BBB) are relatively well known, the phenotype of the component brain capillary endothelial cells (BCECs) has yet to be described in detail. Likewise, the molecular mechanisms that govern the establishment and maintenance of the BBB are largely unknown. Proteomics can be used to assess quantitative changes in protein levels and identify proteins involved in the molecular pathways responsible for cellular differentiation. Using the well-established *in vitro* BBB model developed in our laboratory, we performed a differential nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS study of Triton X-100-soluble protein species from bovine BCECs displaying either limited BBB functions or BBB functions re-induced by glial cells. Due to the heterogeneity of the crude extract, we increased identification yields by applying a repeatable, reproducible fractionation process based on the proteins' relative hydrophobicity. We present proteomic and biochemical evidence to show that tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) and Eps15 homology domain-containing protein 1 (EDH1) are over-expressed by bovine BCECs after the re-induction of BBB properties. We discuss the impact of these findings on current knowledge of endothelial and BBB permeability.

Citation: Deracinois B, Duban-Deweier S, Pottiez G, Cecchelli R, Karamanos Y, et al. (2012) TNAP and EHD1 Are Over-Expressed in Bovine Brain Capillary Endothelial Cells after the Re-Induction of Blood-Brain Barrier Properties. PLoS ONE 7(10): e48428. doi:10.1371/journal.pone.0048428

Editor: Steve Caplan, University of Nebraska Medical Center, United States of America

Received: June 22, 2012; **Accepted:** September 25, 2012; **Published:** October 31, 2012

Copyright: © 2012 Deracinois et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. The mass spectrometry facilities used for this study were funded by the European Regional Development Fund, the Fonds d'Industrialisation des Bassins Miniers (FIBM), the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Université d'Artois. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: christophe.flahaut@univ-artois.fr

Introduction

Over the last decade, it has become clear that the blood-brain barrier (BBB) has a role in a large number of diseases. The BBB is now considered to be an active partner or prime participant [1,2] (rather than a passive target) in diseases such as obesity, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, stroke, brain cancer and diabetes mellitus. Therapeutic research has identified three distinct aspects, depending on the disease in question: (i) selective, transient disruption of the BBB, (ii) the ability to enable a drug to cross the BBB and, in contrast, (iii) the need to stop BBB leakage [3,4].

The morphology and functional properties of the brain capillary endothelial cells (BCECs) that form (with other cells) the BBB are now well documented: a decrease in endothelial permeability, fewer caveolae, the reinforcement of tight junctions, fewer pinocytotic vesicles, an increase in the number of mitochondria and a higher transendothelial electrical resistance [5,6]. Large-scale, directed genomics studies (based on comparative analyses of gene expression catalogues or suppression subtractive hybridization) have provided information on tissue-specific gene expression patterns [7–12]. A genomic comparison of *in vivo* and *in vitro* brain microvascular endothelial cells (ECs) that de-differentiate in culture yielded a functionally diverse set of 10 genes, the expression of which correlated with a barrier phenotype [13]. Recently, a comparative *in vivo* analysis of the transcription of

more than 85 BBB-associated genes showed an overlap in the normal *in situ* expression of these genes along the cerebral vascular tree [14]. Nevertheless, cerebral capillaries preferentially express a number of solute-transport-related genes, whereas cerebral venules tend to express inflammation-related genes. Quantitative PCR profiling of RNA samples from laser capture microdissected microvessels revealed that five membrane protein transcripts (out of 30 selected transcripts) were BBB-specific [15]. Identification of membrane proteins expressed in BBBs could help us to better understand the molecular mechanisms responsible for the barrier's function. Furthermore, selectively expressed proteins may be targets for BBB-related therapeutics.

Concomitantly, recent progress in large-scale and/or differential identification proteomics techniques has generated information on the molecular features of the BCECs [16–22]. The quantification of around 30 mouse plasma membrane proteins was reported in 2008 [23]. This study was followed by the quantitative identification of 114 plasma membrane proteins (transporters and receptors) from human brain microvessels [24].

However, although several glial-produced inductive factors or cellular signalling pathways have been identified in the crosstalk between glial cells and BCECs, the fundamental molecular mechanisms that underlie the establishment and maintenance of this phenotype within BCECs remain misunderstood. Crosstalk

between BCECs and astrocytes was long time regarded as the main cellular influence on induction of a BBB phenotype; but, there is now a growing body of evidence to suggest that integrated brain function and dysfunction arise from complex interactions between many different cell types [25,26].

In order to gain a deeper understanding of BBB-related molecular features, we initiated a non-directed, comparative proteomics approach in order to identify proteins potentially involved in the establishment and maintenance of barrier function in the *in vitro* model developed in our laboratory. The complexity of the crude extract of Triton X-100 solubilized proteins from BCECs prevented efficient mass spectrometry (MS) fragmentation analysis and thus the identification of individual proteins. We therefore decided to apply a fractionation process based on the proteins' relative hydrophobicity [22] and demonstrated its repeatability and reproducibility (data not shown). A comparative, off-line, nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS analysis enabled the identification of 436 and 408 proteins in bovine BCECs with limited BBB functions ("Lim. BBB", after solo-culture) and re-induced BBB functions ("Re-ind. BBB", after co-culture with glial cells), respectively. Eleven of these (ranging from proteins associated with assembly and organization of the cytoskeleton [21] to those involved in vesicular transport and nucleic acid binding) appeared to be more abundantly in the cytoplasm of Re-ind. BBB cells. We present proteomic and biochemical evidence to suggest that tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) and Eps15 homology domain-containing protein 1 (EHD1) are over-expressed at the mRNA and protein levels in Re-ind. BBB cells and that this over-expression is accompanied by an increase in alkaline phosphatase (AP) enzymatic activity detected in the cells. Moreover, we found that endothelial permeability was significantly greater when AP activity was specifically inhibited with levamisole - suggesting that TNAP is involved in the regulation of endothelial permeability.

Experimental Section

Ethics Statement

All methods involving animal cells were approved by the Direction Départementale des services vétérinaires du Pas-de-Calais (approval #B62-498-5). Brain capillary endothelial cells were isolated from the brain of 6-month-old calves purchased from a local slaughterhouse (Douai, France) while the rats (strain Spragues-Dawley Rjhan) come from Janvier (Le Genest-st-Isle, France).

Materials

Heat-inactivated calf serum, fetal calf serum, horse serum and DMEM were purchased from GIBCO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). L-glutamine was from Merck Chemicals (Darmstadt, Germany). Gentamycin was purchased from Biochrom AG (Berlin, Germany). Six-well plates, 100 mm Petri Dishes and Transwell™ inserts were obtained from Corning Inc. (New York, USA). Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid was from Bruker Daltonics (Bremen, Germany). Basic fibroblast growth factor, collagenase, monoclonal anti β -actin antibody and levamisole were supplied by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Polyclonal anti-TNAP was from GeneTex (Irvine, USA). A monoclonal anti-EHD1 antibody and the Alkaline Phosphatase Colorimetric Assay Kit were purchased from Abcam (Paris, France). Anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulins conjugated to HRP were obtained from Dako (Trappes, France). All other reagents were of analytical or electrophoresis grade.

Cell Culture and the BBB Model

Primary cultures of mixed glial cells were initiated from newborn rat cerebral cortex, as described by Booher and Sensenbrenner [27]. Briefly, glial cells were cultured in 100 mm Petri Dishes or six-well plates in DMEM supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine and 50 μ g/ml gentamycin. Three weeks after seeding, the confluent glial cell cultures were used for co-cultures. Bovine BCECs were isolated and characterized as described by Méresse *et al.* [28,29]. Bovine BCECs were cultured for 12 days in the absence of glial cells (i.e. in solo-culture, yielding Lim. BBB functions) or the presence of glial cells (i.e. in co-culture, yielding Re-ind. BBB functions) on a Transwell™ insert (pore size: 0.4 μ m) coated with extracellular matrix protein (rat tail collagen) in DMEM supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated calf serum, 10% (v/v) horse serum, 2 mM glutamine, 50 μ g/ml gentamycin and 1 ng/ml basic fibroblast growth factor. Cells were counted after trypsinization. Immunostaining of integral or associated tight junction proteins (zonulae occludens 1, occludin and claudin-5) was performed as described previously [30].

Cell Harvesting and Protein Extraction

Twenty-four hours after the addition of fresh medium, the ECs growing on a Transwell™ insert (1.5×10^6 Lim. BBB BCECs and 2.7×10^6 cells Re-ind. BBB BCECs) were harvested by treatment with *Clostridium histolyticum* collagenase [21]. Briefly, the cells were treated at 37°C for 45 min with 1.5 ml of a collagenase solution (0.1% w/v). The collected material was rinsed three times in PBS-calcium magnesium free and centrifuged for 10 min at 500 \times g. Cell pellets were lysed in 200 μ l of lysis buffer [Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1% (v/v), 2-mercaptoethanol 0.1% (v/v) and protease inhibitors (Roche Biomoleculars, Meylan, France)], broken up with a Pellet Pestle® homogenizer (Kimble Chase Life Science and Research Products LLC, Vineland, NJ; USA), sonicated (nine 10-second cycles at 30 W) and centrifuged (13500 \times g, 4°C, 1 h). The protein content of the Triton X-100-soluble portion was assayed using Peterson's method [31]. Supernatants were concentrated, desalted and delipidated by overnight organic precipitation at -20°C.

Nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS Experiments

The biological triplicates of Triton-soluble proteins from the Lim. BBB and Re-ind. BBB culture conditions were each fractionated into five sub-fractions (F0, F25, F50, F75 and F100) with increasing concentrations of acetonitrile (0%, 25%, 50%, 75% and 100%, respectively). Briefly, protein pellets were vigorously vortexed at room temperature during 1 h in a pure H₂O solution and centrifuged 5 min at 14000 \times g. The withdrawn supernatant then constitutes the fraction F0. This is repeated with a solution of 25% H₂O/75% acetonitrile (v:v) and so on. The fractions were then subjected to trypsin digestion and the peptide were separated on an U3000 nano-LC system (Dionex-LC-Packings, Sunnyvale, CA, USA). After a standard pre-concentration step (C18 cartridge, 300 μ m, 1 mm), the peptide samples were separated on a Acclaim PepMap100, C18 column (75 μ m i.d. \times 15 cm, 3 μ m, 100 Å) using an acetonitrile gradient (from 5% to 18.5% acetonitrile over 20 min, from 18.5% to 63.5% over 140 min, from 63.5% to 86% over 15 min and then 15 min in 86% acetonitrile). The flow was set to 300 nl/min and a total of 380 fractions were automatically collected (one every 30 s) on an AnchorChip™ 600 MALDI target by using a Proteineer™ fraction collector (Bruker Daltonics). Matrix (1.8 μ l of 0.33 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetone: ethanol: 0.1% TFA, 3:6: 1 v/v/v) was added to each deposit during the collection

process. The MS (reflectron mode) and MS/MS (lift mode) measurements were performed off-line in automatic mode on an UltraflexTM II TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) running FlexControlTM 3.0 software (Bruker Daltonics). External calibration over the 1,000–3,500 mass range was performed using the [M+H]⁺ mono-isotopic ions from bradykinin 1–7, angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin and adrenocorticotrophic hormone (clips 1–17 and clips 18–39) from a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonics). Briefly, each MS spectrum was acquired by accumulating data from 500 laser shots with a 25 kV accelerating voltage, a 26.3 kV reflector voltage and a 160 ns pulsed ion extraction. Peptide fragmentation was driven by Warp LC software 1.1 (Bruker Daltonics), according to the following parameters: signal-to-noise ratio >15, more than 3 MS/MS per spot if the MS signal was available, 0.15 Da of MS tolerance for peak merge and the elimination of peaks that appeared in over 35% of the fractions. Precursor ions were accelerated to 8 kV and selected in a timed ion gate. Metastable ions generated by laser-induced decomposition were further accelerated by 19 kV in the lift cell and their masses were measured in reflectron mode. For precursor and daughter ions, each MS/MS spectrum was produced by accumulating data from 200 and 1,000 laser shots, respectively. Peak lists were generated from MS and MS/MS spectra using FlexanalysisTM 3.0 software (Bruker Daltonics). Proteins were identified on the basis of peptide fragmentation fingerprints, according to published guidelines [32]. Database searches with Mascot 2.2 (Matrix Science Ltd, London, UK) were performed in the UniProtKB/Swiss-Prot 57.13 database via ProteinScape 1.3 (Bruker Daltonics). The mass tolerance was set to 75 ppm for the precursor ions and 0.5 Da for the fragment ions. One missing cleavage site was allowed and variable methionine oxidation was also considered. The relevance of protein identities was judged according to the probability-based molecular weight search score [33] (calculated with $p < 0.05$). The false discovery rate was calculated with the decoy option of the Mascot search engine. LC-MS/MS data are available in the European Bioinformatics Institute's PRIDE database (under accession numbers 22489 to 22498).

Bioinformatics Resources and Protein Lists

Protein lists were compared using nwCompare software [34]. All identified proteins were converted into gene names with the database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID) bioinformatics resources [35], prior to sorting in the protein analysis through evolutionary relationships (PANTHER) classification system (www.pantehrd.org). PANTHER is a resource in which genes have been functionally classified by expert biologists on the basis of published scientific experimental evidence and evolutionary relationships. Proteins are classified into families and subfamilies of shared function, which are then categorized by molecular function and biological process ontology terms [36,37].

One-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D-PAGE) and Western Blot Analysis

Ten μ g of each acetonitrile fraction were separated electrophoretically on a 4–12% Bis-Tris Criterion XT Precast Gel (Bio-Rad), as recommended by the manufacturer (55 min, 200 V). Protein bands were stained with silver nitrate [38] prior to image acquisition. Twenty μ g of Triton X-100-soluble proteins were separated as described above and then electrophoretically transferred (75 min at 100 V and 4°C) to 0.45 μ m polyvinylidene fluoride membrane (Bio-Rad). Membranes were blocked 1 h in TBS (10 mM TRIS and 100 mM NaCl, pH 7.5) containing 0.1% Tween 20 and 5% skimmed milk, incubated with primary

antibody (anti β -actin at 1/10,000, anti-EHD1 at 1/40,000 and anti-TNAP at 1/1,000) in a blocking solution at 4°C (20 min for anti β -actin antibody and overnight for the other antibodies), washed three times and incubated with specific secondary antibody conjugated to HRP (anti-mouse at 1/1,000; anti-rabbit at 1/2,000) for 1 h in a blocking solution. The membranes were then rinsed three times with TBS-Tween. Lastly, the immunoblots were visualized using a chemiluminescent substrate (ECL PlusTM Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Amersham Bioscience, Orsay, France)).

Image Acquisition

Images from 1D-PAGE and Western blot experiments were acquired at 300 dots per inch with a freshly calibrated Umax scanner running Labscan 3.0 software (GE Healthcare). Digitized images were stored in Tagged Image File format. Protein bands were quantified with the TotalLab 100 software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Statistical analysis was performed with PRISM 5 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

RNA Extraction and the Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Bovine BCECs were lysed using RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Valencia, CA, USA). One BCEC-bearing filter was used for each condition and each experiment was performed in triplicate. Total RNA was extracted using an RNeasy kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Single-strand DNA was synthesized from 1 μ g of total RNA by reverse transcription with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Primers were custom-synthesized by Invitrogen (listed in additional Table S1). DNA was amplified under specific conditions by using a cycle of 94°C for 3 min, 25 to 35 cycles (depending on the primer) of 94°C for 30 s, the indicated annealing temperature for 45 s, 72°C for 1 min and a final incubation at 72°C for 10 min. The various RT-PCR products were size-resolved by 1–2% agarose gel electrophoresis, revealed with GelRed[®] nucleic acid gel stain (Interchim, Montluçon, France) and visualized using a Gel DocTM XR device (Bio-Rad). Quantification was carried out with Quantity One software (Bio-Rad) and statistical analysis was performed with PRISM 5 software.

Levamisole-mediated Inhibition and Alkaline Phosphatase Activity Assays

Twenty-four hours after the addition of fresh medium, glial cells were removed (if necessary) and bovine BCECs were incubated for 4 h at 37°C in culture medium supplemented with various concentrations of levamisole (0 mM (the control condition), 1 mM and 5 mM). Transendothelial permeability was then assessed by measuring the kinetics of clearance of 50 μ M Lucifer Yellow (LY) dilithium from the luminal compartment [30]. The transport of LY across the BCECs monolayer was expressed as a permeability coefficient (P_e^{LY} , in cm/min). The AP activity was quantified with an Alkaline Phosphatase Colorimetric Assay Kit (Abcam). Endothelial cell death was assessed using the CytoTox-ONETM Membrane Integrity Assay (Promega Corporation, USA). The extent of cell death in each experimental condition was expressed as percentage of full kill (where the latter corresponded to cells lysed with 9% Triton X-100 (w/v) buffer).

Results

Confirmation of BBB-like Properties

As often reported in the literature [39], primary capillary ECs dedifferentiate after isolation *in vitro* and lose their BBB properties.

The cells' barrier properties were restored by a 12-day co-culture (Figure 1A) in which bovine BCECs were plated on the upper side of a filter placed in a Petri dish containing glial cells. Re-induction of BBB properties was confirmed by the fact that the transendothelial P_e^{LY} was almost two-fold higher for Lim. BBB bovine BCECs (0.8×10^{-3} cm/min) than for Re-ind. BBB cells (0.4×10^{-3} cm/min). Immunostaining also confirmed the presence and localization of the main tight junction proteins (occludin and claudin-5) and the associated intracellular scaffolding protein zonula occludens 1, as described previously [30,40]. Concomitantly, cell numbers per area were about 1.8 fold higher for Re-ind. BBB BCECs than for Lim. BBB BCECs.

Protein Extraction and Fractionation

Bovine BCECs were harvested by collagenase treatment and then lysed with Triton X-100 buffer [21]. The crude Triton X-100 extract was then subjected to in-solution trypsin proteolysis and then off-line nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS analysis. Around 12,000 compounds were detected by MS over the 3 h chromatography run. Unfortunately, the complexity of the samples abolished effective MS/MS fragmentation and only a few proteins were identified (data not shown). The crude extract was therefore divided into the five fractions F0, F25, F50, F75 and F100. As expected on the basis of previous reports [22], the 100% acetonitrile fraction primarily contained the ten major cytoskeletal proteins and was not studied further.

Assessment of Protein Fractionation

A triplicate protein assay was performed on fractions F0 to F75. The protein concentrations ranged from 2 μ g/ μ l to just below 0.1 μ g/ μ l ($\pm 10\%$). There were no significant differences between

homologous fractions, showing that each fraction was equivalent in terms of the amount of protein (data not shown).

The fractions' homogeneity was evaluated by 1D-PAGE and silver nitrate staining (Fig. 1B). The separation profiles showed that the nature of the extracted proteins differed from one fraction to another (with the possible exception of fractions F50 and F75, which has very similar separation profiles). Moreover, the separation profiles for a given fraction were similar under Lim. BBB and Re-ind. BBB conditions. We also observed a lower amount of high-molecular-mass proteins in fraction F25.

Overall Evaluation of Protein Identities

After in-solution proteolysis, each fraction was then subjected to a nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS analysis. Overall, 447 proteins were identified (Fig. 2A) at least twice and had at least one sequenced peptide (LC-MS/MS data are available in the European Bioinformatics Institute's PRIDE database under accession numbers 22489 to 22498). In average, the false discovery rate was of $3\% \pm 0.87$. The computer-assisted, comparative analysis with the nwCompare algorithm [34] revealed that 397 proteins (90%) were common to both BCECs culture conditions, whereas 39 proteins were only identified in Lim. BBB cell extracts and 11 were only identified in Re-ind. BBB cell extracts. Classification of commonly identified proteins according to the biological processes defined by gene ontology (GO) in PANTHER (Fig. 2B) revealed that almost 45% were involved in cell communication and cellular processes (GO:0007154, $\approx 28\%$; GO:0009987, $\approx 15\%$, respectively). Interestingly, about 20% of the identified proteins were involved in molecular localization (GO:0051179, $\approx 10\%$) and molecular transport (GO:0006810, $\approx 8\%$). The fifth category (in terms of decreasing abundance of

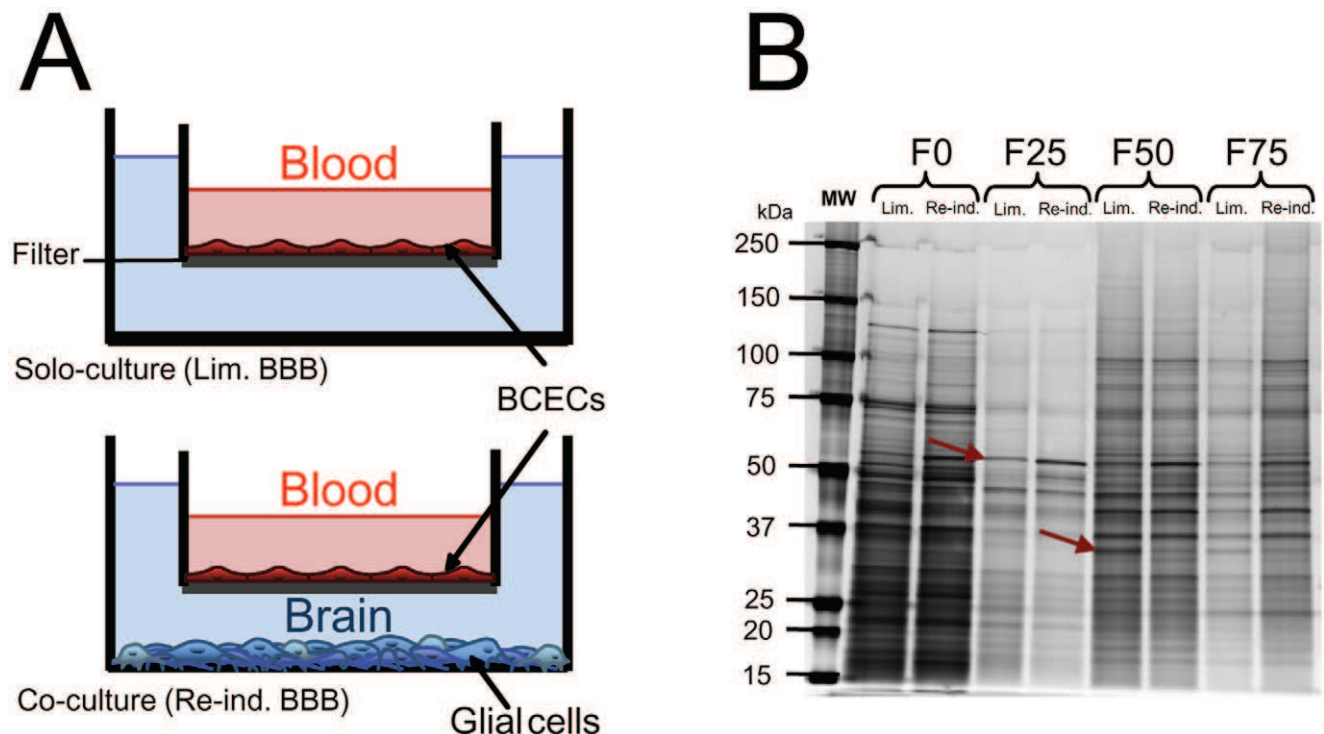


Figure 1. *In vitro* BBB model and assessment of protein fractionation. (A) A schematic drawing of the culture systems used in this study. (B) Gel image from silver-nitrate-stained 1D-PAGE of fractionated Triton X-100-extracted proteins of bovine brain capillary endothelial cells (BCECs) with either limited BBB functions (Lim. BBB) or re-induced BBB functions (Re-ind. BBB). Red arrows correspond to examples of proteins expressed differentially in the two conditions.

doi:10.1371/journal.pone.0048428.g001

identified proteins) concerned proteins involved in cellular component organization (GO:0016043, $\approx 7\%$). Other GO categories (ranging from apoptosis, response to stimulus and regulation of biological process to homeostatic processes) accounted for between 3% and 6% of the remaining proteins.

The PANTHER classification of 39 condition-specific proteins identified in the Lim. BBB BCECs showed that approximately 75% of the proteins were involved in metabolic processes, cellular processes, transport, developmental processes, cellular component organization and cell communication (data not shown).

Reverse Transcription PCR and Immunoblotting: Confirmation of Protein-level Changes

Table 1 summarizes the identities of proteins identified only in one kind of BCEC culture and not in the other. Of the 11 condition-specific proteins identified in Re-ind. BBB BCECs, tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) and Eps15 homology domain (EHD)-containing protein 1 (EHD1) were studied in more detail because of their importance in BBB and vesicular trafficking, respectively. An RT-PCR analysis of mRNA transcript levels (Fig. 3A) demonstrates that the expression levels of TNAP (*ALPL*) and EHD1 (*EHD1*) mRNA transcripts are expressed significantly more strongly in Re-ind. BBB cells than in Lim. BBB cells (+100% for *ALPL* and +30% for *EHD1*) when compared to the unchanged expression level of the β -actin mRNA transcript.

Concomitantly, expression levels of TNAP and EHD1 proteins were checked by immunoblotting and the AP activity was assayed with a commercially available kit (Fig. 3B and Fig. 4A-Control, respectively). Overall protein expression level of β -actin did not differ significantly in the two conditions (Fig. 4B; negative control). As expected, the protein expression levels (Fig. 3B) of TNAP and EHD1 were greater in Re-ind. BBB BCECs. The statistical significance of the fold-changes affecting TNAP and EHD1 was confirmed in paired t-tests. Moreover, AP activity was 3.5-fold higher (or 2-fold higher, when normalized against the number of cells) in Re-ind. BBB cells than in Lim. BBB cells (Fig. 4A-Control).

Levamisole-mediated Inhibition

The influence of TNAP activity on endothelial permeability was investigated by applying the uncompetitive AP inhibitor levamisole [41]. Briefly, Lim. BBB and Re-ind. BBB BCECs were separately incubated for 4 h in culture medium supplemented with 0 mM (control), 1 mM and 5 mM levamisole. A lactate-dehydrogenase-based cytotoxicity activity showed that even the highest concentration of levamisole did not significantly induce cell death during this incubation period (Fig. 4C). The AP assay revealed a dose-dependent decrease in phosphate hydrolysis (Fig. 4A), which reached 95% in Lim. BBB and 86% in Re-ind. BBB BCECs when exposed to 5 mM levamisole. Interestingly, the endothelial monolayer permeability (Fig. 4B) was unaffected at levamisole concentrations of 1 mM, whereas a concentration of 5 mM provoked a 4- fold increase in endothelial permeability in Lim. BBB BCECs but not in Re-ind. BBB BCECs. This result suggests that TNAP protects against the permeability increase mediated by levamisole.

Discussion

Although marked progress has been made over the last decade, the process by which BCECs differentiate to obtain the BBB phenotype is poorly documented in molecular terms. In order to gain a deeper understanding of BBB-related molecular features, we have been applying a range of proteomic tools to our well-characterized *in vitro* BBB model for the last few years. We are particularly seeking to describe the protein abundance changes that occur during the glial cell-driven re-induction of the BBB phenotype in BCECs.

In proteomics, crude extracts of cell proteins are challenging for many reasons: the features of the extracted cell types, the varying abundances of proteins in a cell and the particular properties of hydrophobic proteins. Under these conditions, shotgun approaches can show their limits. We showed that the heterogeneity of a crude Triton X-100-soluble protein extract can be efficiently and reproducibly reduced by organic fractionation before nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS analysis. Ninety percent of the 447 identified proteins were identified in protein extracts from both

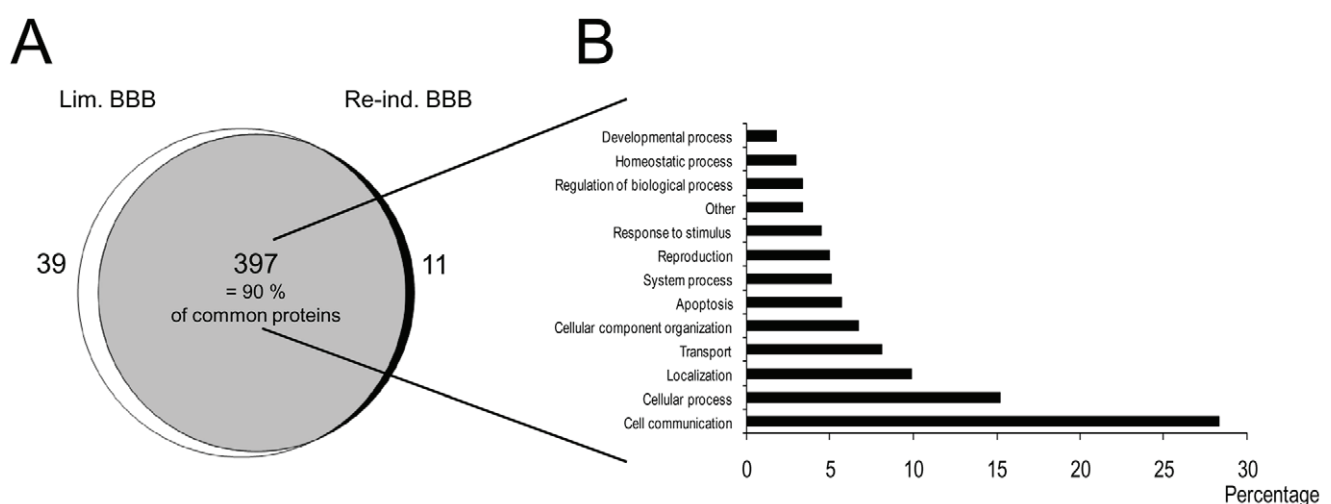


Figure 2. Overall evaluation of protein identities. (A) A Venn diagram showing the common proteins identified in bovine BCECs with limited BBB functions (Lim. BBB) or re-induced BBB functions (Re-ind. BBB) and the proteins identified only in each type of BCEC preparation. (B) Classification by biological processes of the proteins (as identified by nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS) found in both BCEC preparations. After conversion to the homologous human genes, proteins were classified using the PANTHER classification system (<http://www.pantherdb.org>). doi:10.1371/journal.pone.0048428.g002

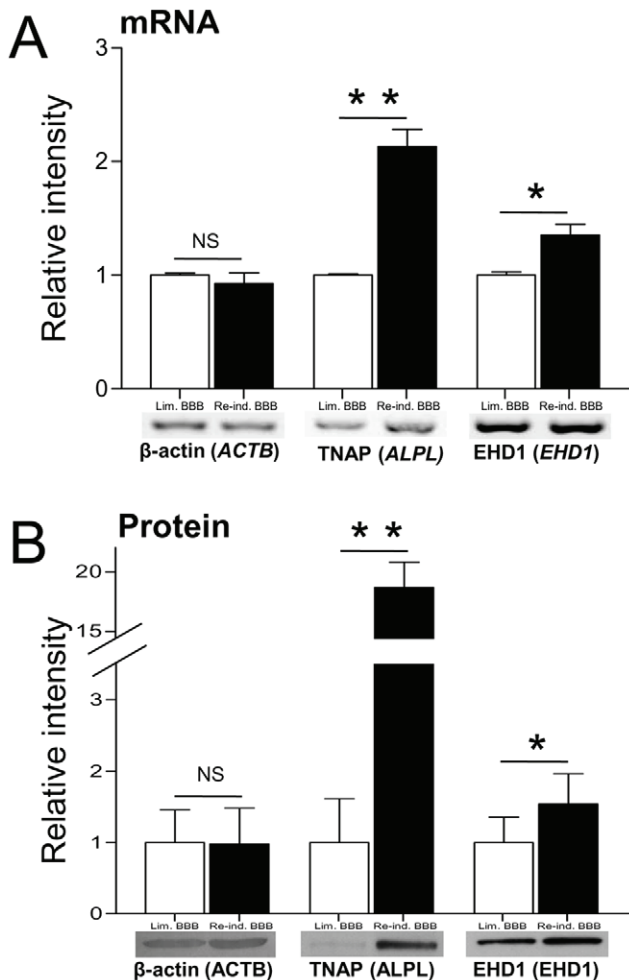


Figure 3. RT-PCR and immunoblotting: confirmation of quantitative changes. (A) RT-PCR analysis: β -actin (ACTB), TNAP (ALPL) and EHD1 (EHD1) mRNA expression detected by RT-PCR analysis from bovine BCECs with limited BBB functions (Lim. BBB) or re-induced BBB functions (Re-ind. BBB). Analysis was performed using the primers and conditions described. (B) Western blot analysis: β -actin (ACTB), TNAP (ALPL) and EHD1 (EHD1) protein levels in Triton X-100 extracts from bovine BCECs. The Western blot analysis was performed using the antibodies and conditions described. Quantitative and statistical analyses were performed with Quantity One (RT-PCR) or TotalLab 100 (Western blots) and PRISM 5 software packages, respectively. The results correspond to the mean \pm SEM from three distinct assays. * $p < 0.03$; ** $p < 0.002$; NS: non-significant (in an unpaired t-test for RT-PCR and a paired t-test for Western blots). The expression of β -actin was monitored as a sample quality control.
doi:10.1371/journal.pone.0048428.g003

Lim. BBB and Re-ind. BBB BCECs, the phenotypes of which are thus not completely different.

In this differential proteomics study with biochemical and immunological confirmation, we generated evidence to show that TNAP was overexpressed at the mRNA and protein levels in Re-ind. BBB BCECs and that the increase in TNAP enzymatic activity was correlated with protein levels. The AP family (EC. 3.1.3.1) catalyzes the hydrolysis of phosphomonoesters to produce inorganic phosphate and an alcohol from a variety of organic compounds: nucleosides (5'-tri-, -di- and -mono- phosphates), pyrophosphate inorganic, pyridoxal-5'-phosphate and phosphorylated proteins [42,43]. Hence, the APs can control not only cellular ectonucleosidase and protein dephosphorylation activities

but also bone mineralization. Notably, astrocytes release ATP and other nucleotides [44]. The APs are dimeric isoenzymes that are bound to the extracellular surface of plasma membrane microdomains by glycosylphosphatidylinositol anchors. In mammalian cells, four isoenzymes have been described and named according to the tissue specificity (or not) of their expression: intestinal alkaline phosphatase, placental alkaline phosphatase, germ cell alkaline phosphatase and liver-type, bone-type or kidney-type TNAP. Expression of the TNAP types depends on alternative transcription initiation processes but results in the same amino acid sequence [45].

Most of the AP expression data in nervous tissue relate to combined enzyme assays and histological studies. The general presence of AP activity in the brain was reported some time ago [46–48] but more precise reports concerning the cerebral parenchyma and the BCECs are more recent [49–51]. This characteristic was also noted in several *in vitro* models of mammalian BBBs [52–54]. Alkaline phosphatase activity has long been used as a brain endothelium marker [55,56]. In fact, TNAP is the only AP isoform found in the brain [57,58]. It has been suggested that BCEC maturation during brain development is corroborated with high TNAP activity [59]. Beck *et al.* [60] first mentioned that TNAP activity was markedly elevated when the ECs were co-cultured with glial cells. This fact was recently confirmed [61] by a study showing that bone-type TNAP is present in neurons and brain ECs in several species. The study also revealed strongly down-regulated expression of the bone TNAP transcript when mouse BCECs were maintained in solo-culture for a few days [61]. Interestingly, a variety of molecules are known to modulate AP expression (retinoic acid [62–64]; cAMP [65]; glucocorticoids [62,66]; transforming growth factor- β [53]; IL-6 [53] and basic fibroblast growth factor [54,67]) and brain capillary endothelial permeability. In the present study, we found that glial-cell-induced TNAP expression prevented a levamisole-induced increase in endothelial permeability - suggesting a protective effect.

The best-investigated function of TNAP is its involvement in bone mineralization and remodeling [68], although this appears to be out of the scope of the BBB field. However, there are several lines of evidence in favor of an important role for TNAP in brain function. Hypophosphatasia is one of several brain diseases that are related (at least in part) to the BBB [69,70]. It results from various mutations of the TNAP gene and is associated with neurological disorders such as mental retardation, seizures and epilepsy [71–73]. Furthermore, TNAP is thought to be involved in neurotransmitter metabolism and the availability of pyridoxal-5'-phosphate (PLP) in the brain [74]. We hypothesize that TNAP may regulate the extracellular concentration of PLP through dephosphorylation, thus allowing pyridoxine (the dephosphorylated form of PLP) to cross the BBB [75]. Interestingly, alimentary B1 avitaminosis reportedly produces a decline in AP activity in the rat brain [76]. Moreover, an alimentary deficiency of vitamin B6 (a precursor of PLP) promotes epileptic seizures (as observed in TNAP $-/-$ mice) – seizures that can be suppressed by administration of the vitamin [77,78]. This co-factor is involved in many different reactions (such as the decarboxylation of amino acids) in the production of a variety of molecules, ranging from neurotransmitters to polyamines [79].

It was recently reported that TNAP (in concert with the ionotropic P2X₇ ATP receptor) promotes axonal growth of hippocampal neurons by regulating (via its ectonucleosidase activity) the extracellular ATP concentration [80]. *In vitro*, TNAP promotes the neurotoxic effect of extracellular Tau protein [81]. *In vivo*, TNAP activity is found to be elevated in the hippocampus of

Table 1. List of proteins identified (in at least two out of three nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS analyses and at least one peptide sequenced) in one type of BCECs and not in the other.

Protein Name	Swiss-Prot Accession	Gene Name	Accession Number	Molecular Weight (Da)	Isoelectric Point	Identification Score ^a	Sequence Coverage (%)	Number of fragmented peptides	Number of fraction	Identified only in ^b
Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHEB_BOVIN	ABHD14B	A7YY28	22 441	6,05	43,9	13	2	2	Re-ind. BBB
ADP-ribosylation factor 4	ARF4_BOVIN	ARF4	Q3SZF2	20 515	5,91	159,7	20,11	2	2	Re-ind. BBB
EH domain-containing protein 1	EHD1_BOVIN	EHD1	Q5E9R3	60 644	6,4	75,7	4,66	2	2	Re-ind. BBB
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	OST48_BOVIN	DDOST	A6QPY0	48 761	5,52	40,7	3,41	1	2	Re-ind. BBB
Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	PPBT_BOVIN	ALPL	P09487	57 156	6,28	42,5	6,1	2	2	Re-ind. BBB
SUMO-activating enzyme subunit 1	SAE1_BOVIN	SAE1	A2VE14	38 281	5,15	84,3	2,77	1	2	Re-ind. BBB
Splicing factor, arginine/serine-rich 9	SFRS9_RAT	SFRS9	Q5PP11	25 482	8,67	33,5	5,42	1	2	Re-ind. BBB
Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	SMHD1_MOUSE	SMCHD1	Q6P5D8	225 506	6,87	41,2	2,7	2	2	Re-ind. BBB
Thioredoxin-related transmembrane protein 2	TMX2_BOVIN	TMX2	Q2TBU2	34 007	8,89	89,4	5	1	2	Re-ind. BBB
Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_BOVIN	TPM1	Q5KR49	32 675	4,69	48,1	2,77	1	3	Re-ind. BBB
Xanthine dehydrogenase/oxidase	XDH_BOVIN	XDH	P80457	146 696	7,97	116,5	3,23	3	3	Re-ind. BBB
26S protease regulatory subunit 6A	PR56A_RAT	Psmc3	Q63569	49 129	5,13	45,1	3,64	1	2	Lim. BBB
Class I histocompatibility antigen, GOGO-A0101 alpha chain	1A01_GORGO		P30375	40 804	5,91	191,1	6,57	2	2	Lim. BBB
Abhydrolase domain-containing protein 11	ABHDB_BOVIN	ABHD11	Q3SZ73	33 527	9,55	46,7	6	1	3	Lim. BBB
Serum albumin	ALBU_BOVIN	ALB	P02769	69 248	5,82	105,9	5,1	2	3	Lim. BBB
Beta-2-microglobulin	B2MG_BOVIN	B2M	P01888	13 668	7,79	114,8	21,18	2	3	Lim. BBB
Carbohydrate sulfotransferase 7	CHST7_RAT	Chst7	Q6XQG8	55 057	9,9	33,4	2,47	1	2	Lim. BBB
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	COX41_BOVIN	COX41	P00423	19 559	9,32	32,5	7,1	1	2	Lim. BBB
Copine-6	CPNE6_BOVIN	CPNE6	O95741	61 952	5,32	53,9	5,38	2	2	Lim. BBB
COP9 signalosome complex subunit 8	CSN8_RAT	Cps8	Q6P4Z9	23 221	5,09	52,1	17,22	2	2	Lim. BBB
Drebrin	DREB_RAT	DBN1	Q07266	77 424	4,46	66	6	2	3	Lim. BBB
Clathrin interactor 1	EPN4_BOVIN	CLINT1	A72035	70 477	6,15	49,1	1	1	3	Lim. BBB
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	GLYM_BOVIN	SHMT2	Q3SZ20	55 570	7,62	73	7,53	2	2	Lim. BBB
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRPR_HUMAN	HNRNPR	O43390	70 899	8,23	49,1	3,47	2	5	Lim. BBB
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDHP_BOVIN	IDH2	Q04467	50 707	8,88	51,6	4,86	2	3	Lim. BBB
Protein KIAA0284	K0284_MOUSE	Kiaa0284	Q80U49	170 718	6,42	34,8	2,7	2	2	Lim. BBB
UMP-CMP kinase	KCY_BOVIN	CMKP1	Q2KIW9	22 265	5,66	55,5	6,12	1	2	Lim. BBB
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM7	LSM7_HUMAN	LSM7	Q9UK45	11 595	5,1	72,9	24,27	2	2	Lim. BBB
Microtubule-associated protein 4	MAP4_BOVIN	MAP4	P36225	111 846	4,85	73,7	2,14	1	2	Lim. BBB
Malignant fibrous histiocytoma-amplified sequence 1	MFHA1_HUMAN	MFHAS1	Q9Y4C4	116 838	8,02	40,8	2,7	2	2	Lim. BBB
Myoferlin	MYOF_HUMAN	MYOF	Q9NZM1	233 177	5,83	95,3	0,92	1	2	Lim. BBB
NHL repeat-containing protein 3	NHLC3_MOUSE	NHLRC3	Q8CCH2	38 171	5,81	47,8	3	1	2	Lim. BBB

Table 1. Cont.

Protein Name	Swiss-Prot Accession	Gene Name	Accession Number	Molecular Weight (Da)	Isoelectric Point	Identification Score ^a	Sequence Coverage (%)	Number of fragmented peptides	Number of fraction	Identified only in ^b
Protein NipSnap homolog 2	NIP52_HUMAN	GBA5	O75323	33 721	9,42	53,9	6	1	2	Lim. BBB
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4HA2_MOUSE	P4HA2	Q60716	60 964	5,55	175,8	13,96	5	8	Lim. BBB
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	P5CS_HUMAN	ALDH18A1	P54886	87 248	6,66	47,2	1,5	1	3	Lim. BBB
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-B	PCATB_RAT	Ayt11b	Q4V8A1	58 526	8,71	45,2	3	2	2	Lim. BBB
Protein disulfide-isomerase A4	PDISA4_BOVIN	PDISA4	Q29RV1	72 481	4,99	50	2,79	1	3	Lim. BBB
PDZ and LIM domain protein 5	PDLI5_RAT	PDLIM5	Q62920	63 161	8,73	48,9	1,86	1	3	Lim. BBB
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	PRPS1_BOVIN	PRPS2	Q2HJ58	34 812	6,51	91,5	2,7	1	2	Lim. BBB
26S protease regulatory subunit S10B	PRS10_BOVIN	PSMC6	Q2KMW6	44 046	6,74	42	5,4	2	2	Lim. BBB
Ras-related protein Rab-2A	RAB2A_RAT	RAB2A	P05712	23 521	6,08	31,2	6,13	1	2	Lim. BBB
RNA-binding protein Raly	RALY_MOUSE	RALY	Q64012	33 138	8,94	39,8	3,52	1	2	Lim. BBB
40S ribosomal protein S14	RS14_RAT	Rps14	P13471	16 249	10,07	96,2	14	1	2	Lim. BBB
Splicing factor 1	SF01_HUMAN	SF1	Q15637	68 286	9,07	67,4	5,55	1	2	Lim. BBB
Sideroflexin-3	SFXN3_BOVIN	SFXN3	A6QP55	35 685	9,66	81,2	9	2	3	Lim. BBB
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	SMD2_BOVIN	SNRPD2	Q3SZF8	13 518	9,92	78,8	16,1	1	2	Lim. BBB
Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	SYTC_BOVIN	TARS	Q3ZBV8	83 439	6,34	62,7	2,9	2	2	Lim. BBB
Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1	TGFA1_BOVIN	TGFBAP1	Q8WUJ2	97 096	6,1	36	2,7	2	2	Lim. BBB
Tax1-binding protein 3	TX1B3_MOUSE	TAX1BP3	Q9DBG9	13 714	8,04	104,5	14,51	1	2	Lim. BBB
Vigilin	VIGLN_RAT	HDLBP	Q9Z1A6	141 496	6,51	49,7	1,65	1	3	Lim. BBB

^aIdentification score: the relevance of protein identities was judged according to the probability-based molecular weight search score [33] (calculated with $p < 0.05$). The significance threshold of ions scores corresponds to the value of 31.

^bProtein identified in brain capillary endothelial cells displaying limited BBB (Lim. BBB) or re-induced BBB (Re-ind. BBB) functions.
doi:10.1371/journal.pone.0048428.t001

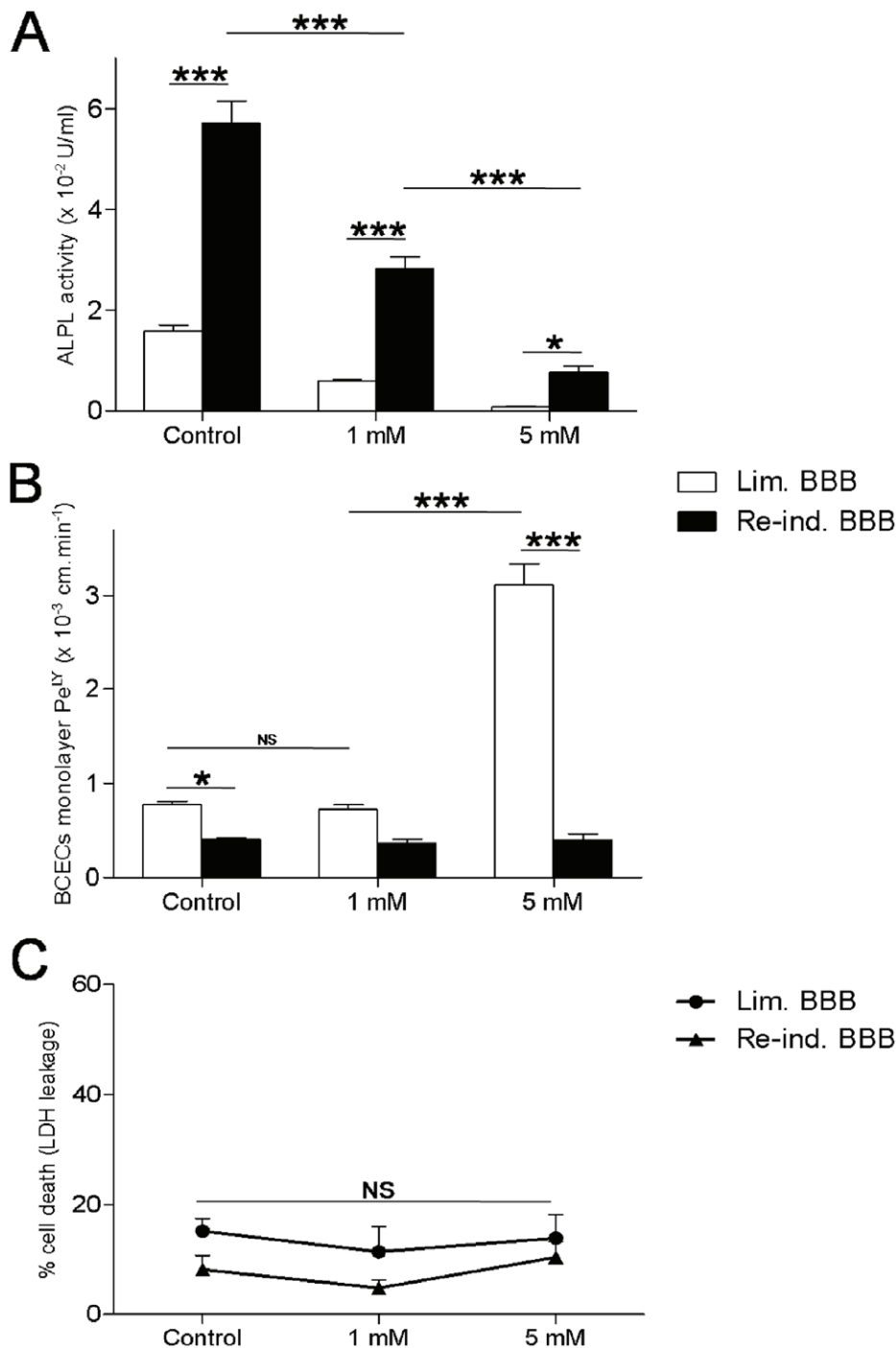


Figure 4. Alkaline phosphatase activity assay and levamisole-mediated inhibition. (A) Alkaline phosphatase activity, (B) monolayer permeability to Lucifer Yellow (Pe^{LY}) and (C) percentage of endothelial cell death (LDH leakage into the culture medium): determined after 4h of incubation of bovine BCECs with limited BBB functions (Lim. BBB) or re-induced BBB functions (Re-ind. BBB) with different concentrations of levamisole (0 to 5 mM). The extent of cell death in each experimental condition was expressed as percentage of full kill (where the latter corresponded to cells lysed with 9% Triton X-100 (w/v) buffer). The statistical analysis was carried out using PRISM 5 software. The results correspond to the mean \pm SEM (N=3, n=9 BCEC monolayers per treatment). The significance of between-experiment differences were tested in a two-way analysis of variance, followed by a Bonferroni *post hoc* test. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; NS: non-significant. doi:10.1371/journal.pone.0048428.g004

patients with AD [82]. Since TNAP promotes the expression of the BBB phenotype in BCECs, one can legitimately suppose that reducing the BBB permeability can enhance Tau-mediated brain lesions by reducing cerebral clearance of the Tau protein.

Despite its known phosphomonoesterase activity, TNAP's putative ability to dephosphorylate protein targets remains subject to debate. Direct proof of TNAP's action on the phosphorylation state of lamini has been reported [58] but contrasts with evidence

to show that TNAP does not modulate the phosphorylation of plasma membrane proteins [83]. A differential proteomics study investigating the phosphoprotein changes that occur in Lim. BBB and Re-ind. BBB BCECs would probably provide valuable information on how the BBB phenotype is established.

Several researchers have suggested that AP is associated with transport systems [84] in general and organic cation transport in particular [85–87]. Here, we found significant, differential expression of the EHD1 at the mRNA transcript and protein levels. The protein is the most extensively studied member (and the archetype) of the Eps15 homology domain (EHD)-containing family. The latter co-controls the endocytic recycling and transport of receptors internalized through clathrin-dependent or -independent endocytic pathways [88]. More specifically, EHD1 is a serum-inducible serine phosphoprotein [89] that is many found in the endocytic recycling compartment [90]. In fact, EHD1 is thought to co-regulate the exit of a wide range of proteins (including the transferrin receptor (TfR) [91], the cystic fibrosis conductance regulator [92], the major histocompatibility complex class I [93], integrin β 1 [94], the glucose transporter type 4 [95]) from this compartment to the plasma membrane. Interestingly, the TfR is specifically expressed on the luminal side of BCECs [96] and levels increase in co-culture with glial cells [97]. Indeed, the TfR is at the heart of efforts seeking to deliver drugs to the brain (see [98] for a review). Given that astrocytes and oligodendrocytes lack TfR, these cells could influence iron import by the BCECs [99]. Synthesis of the TfR is regulated at the mRNA level by five iron-responsive elements present in untranslated mRNA regions, leading to the overexpression of the TfR in iron-depleted situations. However, low extracellular iron levels do not prompt greater TfR expression in BCECs, despite considerably higher blood-to-brain iron transport [100]. This observation suggests that iron depletion raises the recycling rate for endosomes containing TfRs. Although the nature of iron transport across BCECs remains subject to debate (with either receptor-mediated endocytosis or receptor-mediated transcytosis; see [99,101] for a review), it is clear that iron is indeed transported from the blood to the brain and this transport begins by endocytosis of the iron-lactoferrin-TfR complex (after which TfR would recycled to the plasma membrane). Therefore, EHD1 overexpression in Re-ind. BBB BCECs may constitute indirect evidence of faster recycling TfR. Likewise, glucose transporter type 4 and integrin β 1 are expressed by the BBB endothelium [102,103].

It is known that EHD1 can bind directly to a variety of phospholipids [104,105] and regulate cell cholesterol homeostasis - suggesting its involvement in low density lipoprotein-receptor (LRP1) internalization [106]. LRP1-mediated endocytosis has also been mentioned in connection with the internalization of various molecules at the BBB endothelium. Several other proteins also interact with EHD1, including rabenosyn-5, EH-binding protein

1, syndapins I and II and rab11 family-interacting protein 2 (see [107] for a review).

EHD1 also regulates actin dynamics by interacting with the Rho-family members GTPase Rac 1 and cell division control protein 42 homolog (CDC42) [108,109]. We have already reported quantitative changes in levels of actin-related proteins in BCECs displaying BBB features [21,110].

Conclusion

For the first time, we used our novel fractionation method [22] to perform a differential analysis of Triton X-100-soluble proteins extracted from Lim. BBB and Re-ind. BBB BCECs. We demonstrated that the fractionation method was reliable and reproducible. The proteins highlighted by proteomics were validated by biochemical techniques. We identified 11 proteins (notably including TNAP and EHD1) that were overexpressed in Re-ind. BBB BCECs. The overexpression of TNAP and EHD1 was confirmed by RT-PCR, immunoblotting and (for TNAP) an AP assay, thus corroborating previous studies. Our initial results for EHD1 overexpression suggest that endocytic recycling and transport is probably accelerated in ECs with a barrier phenotype. Various lines of evidence indicate that TNAP is involved in the transport of pyridoxine across the BBB and the compound's subsequent use in neurotransmitter metabolism. We also demonstrated that glial-cell-induced TNAP overexpression prevents the increase in endothelial permeability otherwise induced by the uncompetitive AP inhibitor levamisole. This finding suggests that TNAP may be an important component in the establishment and maintenance of the BBB phenotype in BCECs. However, the nature of TNAP actions (i.e. ectonucleosidase or phosphatase activities or both) and the mechanism underlying the enzyme's involvement in the glial-cell-induced process remain to be determined.

Supporting Information

Table S1 DNA primers and conditions used to amplify mRNA.
(XLSX)

Acknowledgments

We thank Dr F. Pont (INSERM, Toulouse) for his help with the use of nwCompare software.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RC YK CF. Performed the experiments: BD SDD GP. Analyzed the data: BD SDD GP. Contributed reagents/materials/analysis tools: BD SDD GP. Wrote the paper: BD RC YK CF.

References

- Hawkins BT, Egleton RD (2008) Pathophysiology of the blood-brain barrier: animal models and methods. *Curr Top Dev Biol* 80: 277–309.
- Banks WA (2010) Mouse models of neurological disorders: a view from the blood-brain barrier. *Biochim Biophys Acta* 1802: 881–888.
- Patel MM, Goyal BR, Bhadada SV, Bhatt JS, Amin AF (2009) Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. *CNS Drugs* 23: 35–58.
- Madsen SJ, Hirschberg H (2010) Site-specific opening of the blood-brain barrier. *J Biophotonics* 3: 356–367.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37: 13–25.
- Nag S (2011) Morphology and properties of brain endothelial cells. *Methods Mol Biol* 686: 3–47.
- Li JY, Boado RJ, Pardridge WM (2001) Blood-brain barrier genomics. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 61–68.
- Shusta EV, Boado RJ, Mathern GW, Pardridge WM (2002) Vascular genomics of the human brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22: 245–252.
- Shusta EV (2005) Blood-brain barrier genomics, proteomics, and new transporter discovery. *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2: 151–161.
- Calabria AR, Shusta EV (2006) Blood-brain barrier genomics and proteomics: elucidating phenotype, identifying disease targets and enabling brain drug delivery. *Drug discovery today* 11: 792–799.
- Enerson BE, Drewes LR (2006) The rat blood-brain barrier transcriptome. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 959–973.
- Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, et al. (2010) The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One* 5: e13741.

13. Calabria AR, Shusta EV (2008) A genomic comparison of in vivo and in vitro brain microvascular endothelial cells. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28: 135–148.
14. Macdonald JA, Murugesan N, Pachter JS (2010) Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature. *J Neurosci Res* 88: 1457–1474.
15. Agarwal N, Lippmann ES, Shusta EV (2010) Identification and expression profiling of blood-brain barrier membrane proteins. *Journal of neurochemistry* 112: 625–635.
16. Haseloff RF, Krause E, Blasig IE (2003) Proteomics of brain endothelium. Separation of proteins by two-dimensional gel electrophoresis and identification by mass spectrometry. *Methods Mol Med* 89: 465–477.
17. Haseloff RF, Krause E, Bigl M, Mikoteit K, Stanimirovic D, et al. (2006) Differential protein expression in brain capillary endothelial cells induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation. *Proteomics* 6: 1803–1809.
18. Haqqani AS, Nesic M, Preston E, Baumann E, Kelly J, et al. (2005) Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19: 1809–1821.
19. Lu L, Yang PY, Rui Y, Kang H, Zhang J, et al. (2007) Comparative proteome analysis of rat brain and coronary microvascular endothelial cells. *Physiol Res* 56: 159–168.
20. Lu Q, Murugesan N, Macdonald JA, Wu SL, Pachter JS, et al. (2008) Analysis of mouse brain microvascular endothelium using immuno-laser capture microdissection coupled to a hybrid linear ion trap with Fourier transform-mass spectrometry proteomics platform. *Electrophoresis* 29: 2689–2695.
21. Pottiez G, Sevin E, Cecchelli R, Karamanos Y, Flahaut C (2009) Actin, gelsolin and filamin-A are dynamic actors in the cytoskeleton remodelling contributing to the blood brain barrier phenotype. *Proteomics* 9: 1207–1219.
22. Pottiez G, Deracinois B, Duban-Deweer S, Cecchelli R, Fenart L, et al. (2010) A large-scale electrophoresis- and chromatography-based determination of gene expression profiles in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties. *Proteome Sci* 8: 57.
23. Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, Ohmine K, Katsukura Y, et al. (2008) Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm Res* 25: 1469–1483.
24. Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, et al. (2011) Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *Journal of neurochemistry* 117: 333–345.
25. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41–53.
26. Lok J, Gupta P, Guo S, Kim WJ, Whalen MJ, et al. (2007) Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res* 32: 2032–2045.
27. Booher J, Sensenbrenner M (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 2: 97–105.
28. Meresse S, Dehouck MP, Delorme P, Bensaid M, Tauber JP, et al. (1989) Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J Neurochem* 53: 1363–1371.
29. Meresse S, Delbart C, Fruchart JC, Cecchelli R (1989) Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem* 53: 340–345.
30. Culot M, Lundquist S, Vanuxeem D, Nion S, Landry C, et al. (2008) An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro* 22: 799–811.
31. Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346–356.
32. Wilkins MR, Appel RD, Van Eyk JE, Chung MC, Gorg A, et al. (2006) Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics* 6: 4–8.
33. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551–3567.
34. Pont F, Fournier JJ (2010) Sorting protein lists with nwCompare: a simple and fast algorithm for n-way comparison of proteomic data files. *Proteomics* 10: 1091–1094.
35. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44–57.
36. Mi H, Dong Q, Muruganujan A, Gaudet P, Lewis S, et al. (2007) PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res* 35: D204–210.
37. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, et al. (2003) PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 13: 2129–2141.
38. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850–858.
39. Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renfel M, et al. (2007) Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 6: 650–661.
40. Gosselet F, Candela P, Sevin E, Berezowski V, Cecchelli R, et al. (2009) Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Res* 1249: 34–42.
41. Van Belle H (1976) Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. *Clin Chem* 22: 972–976.
42. Chan JR, Stinson RA (1986) Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 261: 7635–7639.
43. Millan JL (2006) Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal* 2: 335–341.
44. Montana V, Malarkey EB, Verderio C, Matteoli M, Parpura V (2006) Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia* 54: 700–715.
45. Matsuura S, Kishi F, Kajii T (1990) Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 993–1000.
46. Meunier MT, Bouchaud C (1978) [Histochemical contribution to the study of the rat blood-brain barrier (author's transl)]. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 67: 81–98.
47. Ehrlich YH, Davis TB, Bock E, Kornecki E, Lenox RH (1986) Ecto-protein kinase activity on the external surface of neural cells. *Nature* 320: 67–70.
48. Plesner L (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 158: 141–214.
49. Zoellner HF, Hunter N (1989) Histochemical identification of the vascular endothelial isoenzyme of alkaline phosphatase. *J Histochem Cytochem* 37: 1893–1898.
50. Fonta C, Nagyessy L, Renaud L, Barone P (2004) Areal and subcellular localization of the ubiquitous alkaline phosphatase in the primate cerebral cortex: evidence for a role in neurotransmission. *Cereb Cortex* 14: 595–609.
51. Fonta C, Nagyessy L, Renaud L, Barone P (2005) Postnatal development of alkaline phosphatase activity correlates with the maturation of neurotransmission in the cerebral cortex. *J Comp Neurol* 486: 179–196.
52. Meyer J, Mischek U, Veyhl M, Henzel K, Galla HJ (1990) Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 514: 305–309.
53. Nakazato H, Deguchi M, Fujimoto M, Fukushima H (1997) Alkaline phosphatase expression in cultured endothelial cells of aorta and brain microvessels: induction by interleukin-6-type cytokines and suppression by transforming growth factor betas. *Life Sci* 61: 2065–2072.
54. Sobue K, Yamamoto N, Yoneda K, Hodgson ME, Yamashiro K, et al. (1999) Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci Res* 35: 155–164.
55. Bell MA, Ball MJ (1985) Laminar variation in the microvascular architecture of normal human visual cortex (area 17). *Brain Res* 335: 139–143.
56. Anstrom JA, Brown WR, Moody DM, Thore CR, Challa VR, et al. (2002) Temporal expression pattern of cerebrovascular endothelial cell alkaline phosphatase during human gestation. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 76–84.
57. Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, et al. (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* 334: 199–217.
58. Ermonval M, Baudry A, Baychelier F, Pradines E, Pietri M, et al. (2009) The cellular prion protein interacts with the tissue non-specific alkaline phosphatase in membrane microdomains of bioaminergic neuronal cells. *PLoS One* 4: e6497.
59. Dermietzel R, Krause D (1991) Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry. *Int Rev Cytol* 127: 57–109.
60. Beck DW, Roberts RL, Olson JJ (1986) Glial cells influence membrane-associated enzyme activity at the blood-brain barrier. *Brain Res* 381: 131–137.
61. Brun-Heath I, Ermonval M, Chabrol E, Xiao J, Palkovits M, et al. (2010) Differential expression of the bone and the liver tissue non-specific alkaline phosphatase isoforms in brain tissues. *Cell Tissue Res* 343: 521–536.
62. Adams SE, Melnykovich G (1985) Synergistic stimulation of alkaline phosphatase activity in bovine aortic endothelial cells grown in the presence of retinoids and glucocorticoids. *J Cell Physiol* 124: 120–124.
63. Zhou H, Manji SS, Findlay DM, Martin TJ, Heath JK, et al. (1994) Novel action of retinoic acid. Stabilization of newly synthesized alkaline phosphatase transcripts. *J Biol Chem* 269: 22433–22439.
64. Lechardeur D, Schwartz B, Paulin D, Scherman D (1995) Induction of blood-brain barrier differentiation in a rat brain-derived endothelial cell line. *Exp Cell Res* 220: 161–170.
65. Beuckmann C, Hellwig S, Galla HJ (1995) Induction of the blood/brain-barrier-associated enzyme alkaline phosphatase in endothelial cells from cerebral capillaries is mediated via cAMP. *Eur J Biochem* 229: 641–644.
66. Mulkins MA, Allison AC (1987) Recombinant human interleukin-1 inhibits the induction by dexamethasone of alkaline phosphatase activity in murine capillary endothelial cells. *J Cell Physiol* 133: 539–545.
67. Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Claire M, Mailly P, et al. (1994) Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol* 159: 101–113.
68. Kaunitz JD, Yamaguchi DT (2008) TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *J Cell Biochem* 105: 655–662.
69. Grammas P, Martinez J, Miller B (2011) Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert Rev Mol Med* 13: e19.

70. Palmer AM (2009) The role of the blood-CNS barrier in CNS disorders and their treatment. *Neurobiol Dis* 37: 3–12.
71. Mabry CC, Bautista A, Kirk RF, Dubiliet LD, Braunstein H, et al. (1970) Familial hyperphosphatase with mental retardation, seizures, and neurologic deficits. *J Pediatr* 77: 74–85.
72. Whyte MP (1994) Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 15: 439–461.
73. Oby E, Janigro D (2006) The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* 47: 1761–1774.
74. Balasubramaniam S, Bowling F, Carpenter K, Earl J, Chaitow J, et al. (2010) Perinatal hypophosphatasia presenting as neonatal epileptic encephalopathy with abnormal neurotransmitter metabolism secondary to reduced co-factor pyridoxal-5'-phosphate availability. *J Inher Metab Dis*.
75. Yarlagadda A, Clayton AH (2007) Blood brain barrier: the role of pyridoxine. *Psychiatry (Edgmont)* 4: 58–60.
76. Pron'ko PS, Gritsenko EA, Ostrovskii Iu M (1975) [Changes in the activity of alkaline phosphatase and the level of thiamine diphosphatase in simulations of B1 avitaminosis]. *Vopr Pitan*: 48–54.
77. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, et al. (1995) Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet* 11: 45–51.
78. Narisawa S, Wennberg C, Millan JL (2001) Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *J Pathol* 193: 125–133.
79. di Salvo ML, Contestabile R, Safo MK (2011) Vitamin B(6) salvage enzymes: mechanism, structure and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1814: 1597–1608.
80. Diez-Zacra M, Diaz-Hernandez JI, Hernandez-Alvarez E, Zimmermann H, Diaz-Hernandez M, et al. (2011) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 22: 1014–1024.
81. Diaz-Hernandez M, Gomez-Ramos A, Rubio A, Gomez-Villafuertes R, Naranjo JR, et al. (2010) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J Biol Chem* 285: 32539–32548.
82. Vardy ER, Kellett KA, Cocklin SL, Hooper NM (2012) Alkaline Phosphatase Is Increased in both Brain and Plasma in Alzheimer's Disease. *Neurodegener Dis* 9: 31–37.
83. Fedde KN, Michel MP, Whyte MP (1993) Evidence against a role for alkaline phosphatase in the dephosphorylation of plasma membrane proteins: hypophosphatasia fibroblast study. *J Cell Biochem* 53: 43–50.
84. Calhau C, Hipolito-Reis C, Azevedo I (1999) Alkaline phosphatase and exchange surfaces. *Clin Biochem* 32: 153–154.
85. Martel F, Ribeiro L, Calhau C, Azevedo I (1999) Inhibition by levamisole of the organic cation transporter rOCT1 in cultured rat hepatocytes. *Pharmacol Res* 40: 275–279.
86. Calhau C, Martel F, Soares-da-Silva P, Hipolito-Reis C, Azevedo I (2002) Regulation of [(3)H]MPP(+) transport by phosphorylation/dephosphorylation pathways in RBE4 cells: role of ecto-alkaline phosphatase. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 365: 349–356.
87. Calhau C, Martel F, Pinheiro-Silva S, Pinheiro H, Soares-da-Silva P, et al. (2002) Modulation of insulin transport in rat brain microvessel endothelial cells by an ecto-phosphatase activity. *J Cell Biochem* 84: 389–400.
88. Kicken F, Jovic M, Naslavsky N, Caplan S, Sorgen PL (2007) EH domain of EHD1. *J Biomol NMR* 39: 323–329.
89. Fichtman B, Ravid L, Rapaport D, Horowitz M (2008) EHDS are serine phosphoproteins: EHD1 phosphorylation is enhanced by serum stimulation. *Cell Mol Biol Lett* 13: 632–648.
90. Mintz L, Galperin E, Pasmanik-Chor M, Tulzinsky S, Bromberg Y, et al. (1999) EHD1—an EH-domain-containing protein with a specific expression pattern. *Genomics* 59: 66–76.
91. Lin SX, Grant B, Hirsh D, Maxfield FR (2001) Rme-1 regulates the distribution and function of the endocytic recycling compartment in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 3: 567–572.
92. Picciano JA, Ameen N, Grant BD, Bradbury NA (2003) Rme-1 regulates the recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1009–1018.
93. Caplan S, Naslavsky N, Hartnell LM, Lodge R, Polishchuk RS, et al. (2002) A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *Embo J* 21: 2557–2567.
94. Jovic M, Naslavsky N, Rapaport D, Horowitz M, Caplan S (2007) EHD1 regulates beta1 integrin endosomal transport: effects on focal adhesions, cell spreading and migration. *J Cell Sci* 120: 802–814.
95. Guilherme A, Soriano NA, Furcinitti PS, Czech MP (2004) Role of EHD1 and EHBPI in perinuclear sorting and insulin-regulated GLUT4 recycling in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279: 40062–40075.
96. Jefferies WA, Brandon MR, Hunt SV, Williams AF, Gatter KC, et al. (1984) Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* 312: 162–163.
97. Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, et al. (1997) Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19: 13–26.
98. Jones AR, Shusta EV (2007) Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharmaceutical research* 24: 1759–1771.
99. Moos T, Rosengren Nielsen T, Skjorringe T, Morgan EH (2007) Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem* 103: 1730–1740.
100. Taylor EM, Crowe A, Morgan EH (1991) Transferrin and iron uptake by the brain: effects of altered iron status. *J Neurochem* 57: 1584–1592.
101. Rouault TA, Cooperman S (2006) Brain iron metabolism. *Semin Pediatr Neurol* 13: 142–148.
102. Ngarmukos C, Baur EL, Kumagai AK (2001) Co-localization of GLUT1 and GLUT4 in the blood-brain barrier of the rat ventromedial hypothalamus. *Brain Res* 900: 1–8.
103. Cayrol R, Haqqani AS, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Prat A (2011) Isolation of human brain endothelial cells and characterization of lipid raft-associated proteins by mass spectrometry. *Methods in molecular biology* 686: 275–295.
104. Naslavsky N, Rahajeng J, Chenavas S, Sorgen PL, Caplan S (2007) EHD1 and Eps15 interact with phosphatidylinositols via their Eps15 homology domains. *J Biol Chem* 282: 16612–16622.
105. Jovic M, Kicken F, Naslavsky N, Sorgen PL, Caplan S (2009) Eps15 homology domain 1-associated tubules contain phosphatidylinositol-4-phosphate and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate and are required for efficient recycling. *Mol Biol Cell* 20: 2731–2743.
106. Naslavsky N, Rahajeng J, Rapaport D, Horowitz M, Caplan S (2007) EHD1 regulates cholesterol homeostasis and lipid droplet storage. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 792–799.
107. Grant BD, Caplan S (2008) Mechanisms of EHD/RME-1 protein function in endocytic transport. *Traffic* 9: 2043–2052.
108. Ikeda M, Ishida O, Hinoi T, Kishida S, Kikuchi A (1998) Identification and characterization of a novel protein interacting with Ral-binding protein 1, a putative effector protein of Ral. *J Biol Chem* 273: 814–821.
109. Yamaguchi A, Urano T, Goi T, Feig LA (1997) An Eps homology (EH) domain protein that binds to the Ral-GTPase target, RalBP1. *J Biol Chem* 272: 31230–31234.
110. Pottiez G, Duban-Deweer S, Deracinois B, Gosselet F, Camoin L, et al. (2011) A differential proteomic approach identifies structural and functional components that contribute to the differentiation of brain capillary endothelial cells. *J Proteomics* 75: 628–641.

Chapitre IV

Stratégie ICPL pour l'identification et la quantification de protéines issues des BCECs et induites par les cellules gliales : implication de protéines antioxydantes dans le phénotype BHE

Sommaire

1. Marquage ICPL : principe et mises au point.....	- 157 -
1.1. Principe du marquage des protéines par la stratégie ICPL.....	- 157 -
1.2. Mises au point.....	- 158 -
1.3. Stratégie employée	- 162 -
2. Analyse par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS des hydrolysats tryptiques des fractions	- 164 -
2.1. Cartes peptidiques	- 164 -
2.2. Homogénéité des données de spectrométrie de masse.....	- 165 -
2.3. Analyse globale des identifications et de la quantification	- 166 -
3. Validation biochimique de deux protéines d'intérêt : la superoxyde dismutase 1 (SODC) et la protéine DJ-1	- 172 -
4. Discussion	- 173 -
4.1. Analyses ICPL nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS	- 173 -
4.2. Identifications protéiques	- 175 -

L'analyse comparative de type booléenne (absence/présence) des résultats obtenus par approche *label free* des fractions de protéines issues des BCECs solo-cultivées et co-cultivées nous a permis d'identifier un bon nombre de protéines (447) dont deux d'entre elles ont été plus profondément étudiées sur les plans biochimique et cellulaire. Cette stratégie *label free* nous a apporté certes une notion d'identification mais ne nous a pas apporté d'information quantitative concernant les protéines communes entre les deux conditions cellulaires (mis à part les validations biochimiques). Dès lors, nous souhaitons mettre en place une approche quantitative des protéines issues des BCECs des deux conditions cellulaires, afin de caractériser les voies potentiellement impliquées dans la ré-induction et/ou le maintien, induit par la présence des cellules gliales, du phénotype BHE. Dans cette optique plusieurs stratégies s'offraient à nous :

- les stratégies de quantification « en gel »,
- les stratégies de quantification « hors gel ».

La comparaison des deux conditions cellulaires et la quantification des protéines « en gel » ont déjà été réalisées par 2D-PAGE et 2D-DIGE. Afin de surmonter les problèmes inhérents à l'utilisation de gel d'électrophorèse (voir chapitre III de l'étude bibliographique) et de compléter les analyses déjà effectuées, une étude de quantification « hors gel » nous semblait opportune.

Comme décrites dans le chapitre III de l'étude bibliographique, plusieurs stratégies concernant les techniques de quantification « hors gel » s'offraient à nous. Dans un souci d'homogénéité et de comparabilité des échantillons biologiques vis-à-vis des expérimentations réalisées par électrophorèse bidimensionnelle, parce que nous souhaitons réaliser l'analyse et la quantification du sous-protéome et non du peptidome (mélange complexe de peptides générés par protéolyse du mélange complexe de protéines) des BCECs, notre choix s'est porté sur le marquage *in vitro* des protéines par l'approche ICPL (*isotope-coded protein label*) rapportée en 2005 et depuis développée par Serva Electrophoresis et Bruker Daltonics (Schmidt *et al.*, 2005). Cette stratégie quantitative par marquage pré-analytique permet une quantification à partir de mélange complexe de protéines.

1. Marquage ICPL : principe et mises au point

1.1. Principe du marquage des protéines par la stratégie ICPL

La stratégie ICPL consiste en un marquage des fonctions amine libres des protéines (Figure 30), la lysine étant un acide aminé bien mieux représenté au sein des protéines que la cystéine. La molécule traceuse est le **N-nicotinoyloxy-succinimide** constituée d'isotopes 12 du carbone ($^{12}\text{C}_6$) pour le réactif léger et d'isotopes 13 du carbone ($^{13}\text{C}_6$) pour le réactif lourd. La différence de masse est donc de 6 unités de masse atomique (uma) ($\Delta\text{Da} = 6,02 \text{ Da}$) entre les

deux réactifs. L'un des avantages majeurs de cette stratégie est que la quantification relative ne repose pas sur la fragmentation (MS/MS) des peptides marqués mais repose uniquement sur la recherche et la comparaison quantitative (en mode MS), dans une même fraction chromatographique, des signaux de masse distants de 6, 12 ou 18 uma (ou plus) selon le nombre de fonctions amine dérivées (jusqu'à 6 marqueurs par peptide). L'identification des protéines se fait, quant à elle, en mode MS/MS. Le second avantage est que le dérivé nicotinique couplé aux peptides lors de la phase de marquage permet une amplification de l'ionisation (augmentation du signal MS) et de la fragmentation (amélioration de la qualité des spectres de fragmentation). L'intensité du signal des peptides marqués est 10 à 20 fois plus élevée que celle des peptides non marqués (Suckau *et al.*, 2006).

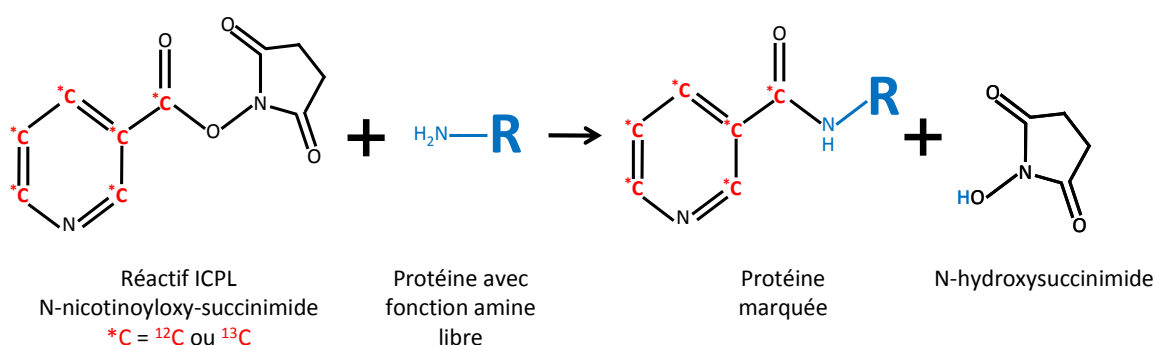


Figure 30 : Réaction chimique survenant lors du couplage covalent des fonctions amine libres (NH₂) des protéines avec le réactif ICPL.

Le réactif ICPL est l'acide succinimide nicotinique ou *N*-nicotinoyloxy-succinimide composé soit de 6 ¹²C, réactif léger (105,0215 Da), ou de 6 ¹³C, réactif lourd (111,0419 Da). L'incrément de masse après marquage est alors de 6,0204 Da pour chaque groupement amino libre modifié (résidu lysine et extrémité N-terminale, à l'exception de l'arginine, de la glutamine et de l'asparagine).

1.2. Mises au point

1.2.1. Marquage d'un mélange de six protéines

Pour des raisons de coût, de temps et de matériel, le marquage ICPL sur nos extraits protéiques (Triton X-100) fractionnés (et notamment la fraction F75) issus des BCECs ne pouvait pas être effectué sur trois réplicats biologiques. Pour cette raison, cette technique de marquage a d'abord été réalisée sur un mélange standardisé de 6 protéines (phosphorylase b, albumine, ovalbumine, anhydrase carbonique, inhibiteur de trypsine et α -lactalbumine) de concentrations connues afin d'évaluer sa précision et sa reproductibilité. Le marquage ICPL a ainsi été effectué sur 50 μ g (marquage léger) et 100 μ g (marquage lourd) de ce mélange, selon les recommandations du fabricant (Serva, Heidelberg, Germany) (Schmidt *et al.*, 2005). Les réactifs utilisés proviennent du kit ICPL. Globalement, les protéines sont réduites, alkylées et marquées avec le réactif ICPL léger ou le réactif ICPL lourd avant d'être combinées puis

digérées par la trypsine et analysées par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS. La recherche en banque de données a été réalisée dans UniProtKB/Swiss-Prot 2012_01 *via* ProteinScape 2.1 (Bruker Daltonics) et Mascot 2.3 (Matrix Science Ltd, London, UK). Pour ce faire, la tolérance de masse a été fixée à 75 ppm pour les ions précurseurs et 0,5 Da pour les ions fragments. La carbamidométhylation a été définie comme une modification fixe des cystéines, alors que l'oxydation des méthionines et la nicotinoylation ^{12}C / ^{13}C des lysines et des extrémités N-terminales ont été définies comme modifications variables. La pertinence des identifications de protéines est estimée par le *probability-based molecular weight search score* (Perkins *et al.*, 1999) (calculé avec $p < 0,05$). Le traitement des données pour la quantification des protéines est réalisé grâce à WARP-LC 1.2 et ProteinScape 2.1. Ce dernier permet le calcul du ratio des paires peptidiques (Lim. BBB / Re-ind. BBB) par comparaison de l'intensité de leur signal respectif. La quantification des protéines se fait sur la base de la médiane (afin de minimiser l'influence des protéines hautement régulées) des différents ratios des peptides observés, après élimination manuelle des valeurs aberrantes.

Le Tableau VI reprend les résultats obtenus dans le cadre de cette étape de prise en main expérimentale suite à l'injection d'environ 2 μg de peptides (capacité maximale de la colonne chromatographique utilisée) issus du marquage des six protéines en nano-LC (phase inverse, gradient d'ACN d'une heure) suivie d'une analyse MALDI-TOF/TOF-MS. La reproductibilité de ces analyses est excellente (donnée non montrée).

Compte tenu de la faible complexité du mélange protéique, toutes les protéines sont bien évidemment identifiées. La couverture de séquence des protéines varie de 14,79 à 70,58 % avec des scores d'identification allant de 142 à 3100. Il est d'ores et déjà intéressant de noter que plus la protéine possède une MM importante, plus le nombre de peptides fragmentés et le score d'identification sont importants. Il en va en général de même pour le pourcentage de couverture de séquence, à l'exception de celui de la sérum albumine bovine, alors que la quantité de protéine ne joue en rien sur ces paramètres. En revanche, même sur un mélange protéique simple, toutes les protéines ne sont pas quantifiées. En effet, seule l' α -lactalbumine n'a pas été quantifiée car, compte tenu de sa faible MM, elle n'est identifiée que sur la base d'un seul peptide non marqué. L' α -lactalbumine n'est pourtant ni un inhibiteur de l'enzyme de choix utilisée en protéomique (la trypsine) ni la protéine possédant la plus faible quantité. L'analyse de la séquence en acide aminé de cette protéine révèle la présence d'un seul résidu arginine pour 12 résidus lysine et la présence de 4 ponts disulfure, expliquant le faible taux de clivage. Parallèlement, l'inhibiteur tryptique du soja est, quant à lui, quantifié avec un unique peptide marqué (pour 9 peptides séquencés) alors que les quatre autres sont quantifiées avec au moins 5 peptides marqués (pour un nombre de peptides séquencés allant de 24 à 80).

In fine, malgré la difficulté de quantifier les protéines de faible MM, le marquage ICPL sur ce mélange de 6 protéines permet d'obtenir des facteurs de régulation possédant des

déviations standards correctes (de 0,02 à 0,15) ainsi qu'une erreur de quantification (par rapport au facteur de régulation attendu de 0,5) ne dépassant pas 14 %.

Tableau VI : Test du marquage ICPL sur un mélange de 6 protéines.

Nom de la protéine	Accession SwissProt	Quantité marquée (µg) pour 100 µg de mélange	Masse moléculaire (kDa)	Score d'identification *	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptide fragmenté	Nombre de peptide quantifié	Facteur de régulation \pm SD	% d'erreur
<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	PYGM_RABIT	11,63	97	3100,62	70,58	80	19	0,47 \pm 0,02	6
<i>Serum albumin</i>	ALBU_BOVIN	14,41	66	2108,29	57,83	50	11	0,45 \pm 0,05	10
<i>Ovalbumin</i>	OVAL_CHICK	25,52	45	1971,54	66,58	39	7	0,43 \pm 0,02	14
<i>Carbonic anhydrase 2</i>	CAH2_BOVIN	14,41	30	1340,76	63,85	24	5	0,49 \pm 0,15	2
<i>Trypsin inhibitor A</i>	ITRA_SOYBN	13,89	20,1	354,97	30,09	9	1	0,49 \pm ND	2
<i>Alpha-lactalbumin</i>	LALBA_BOVIN	20,14	14,4	142,58	14,79	1			

Les marquages léger (L) et lourd (H) sont effectués respectivement sur 50 et 100 µg d'un mélange de six protéines. Le facteur de régulation correspondant à L/H est attendu à 0.5.

* Score d'identification : la relevance des identités protéiques est jugée par le *probability-based molecular weight search score* (calculé avec $p < 0,05$).

Le même test réalisé par Schmidt *et al.*, 2005 sur un mélange de 6 protéines révèle un faible pourcentage d'erreur (1 à 4,3 %), une couverture de séquence correcte (concernant uniquement les peptides marqués) (32,5 à 73,1 %) et une déviation standard des ratios du même ordre que notre expérimentation (0,02 à 0,17). Les auteurs rapportent un rendement de marquage de 99,8 %.

Quelle que soit l'étude, aucun signal de l'acide nicotinique ou d'un peptide fragment ayant perdu son marquage à la suite de la fragmentation n'est détecté prouvant la stabilité du marquage ICPL.

1.2.2. Marquage d'un extrait protéique de BCECs

Le marquage ICPL a ensuite été mis au point sur les extraits protéiques des fractions F0 et F25 des BCECs solo- ou co-cultivées. Plusieurs points d'optimisation ont alors été évalués afin d'aboutir au meilleur taux de peptides quantifiés :

- parce que toutes les réactions chimiques (ou biochimiques), à l'exception des réactions d'ordre 0, sont dépendantes de la quantité des réactifs, nous avons, dans un premier temps, joué sur la quantité de protéines utilisée pour le marquage. En raison des faibles concentrations de la fraction F75 issues des lysats protéiques (Triton X-100) des BCECs (0,1 µg/µl), la quantité maximale de protéine qu'il nous est possible d'obtenir en une expérience pour cette fraction est de 60 µg. Nous avons donc testé le marquage sur deux quantités différentes de protéines : 100 µg (quantité recommandée pour le marquage) et 60 µg (50 µg étant la quantité minimale recommandée). Le marquage sur **60 µg** ne jouant pas sur les résultats obtenus, cette quantité a donc été retenue ;

- le marquage ICPL s'effectuant sur les résidus ϵ -amino libres des protéines, leur protéolyse par la trypsine ne peut avoir lieu au niveau des résidus de lysine marqués (mais uniquement au niveau des résidus de lysine non-marqués et des résidus d'arginine). Des peptides plus grands, plus difficiles à fragmenter, sont alors générés. Nous avons donc souhaité évaluer l'intérêt de l'utilisation d'une seconde enzyme de digestion pour contrecarrer cet état de fait. Pour ce faire, nous avons opté pour une double digestion trypsine / Glu-C. Les résultats issus de cette analyse n'ont montré aucune différence en termes d'identification peptidique entre une digestion tryptique simple et une double digestion. En effet, quasiment aucun peptide généré par l'action de la Glu-C n'a été identifié par le spectromètre de masse. La Glu-C étant une enzyme sensible nous n'avons pas réussi à réunir les conditions nécessaires pour la rendre efficace ;

- les étapes de nano-LC et de spectrométrie de masse conditionnent également les conditions opératoires de marquage. Afin d'être plus efficace, la protéolyse des échantillons marqués par la stratégie ICPL doit se faire en milieu tamponné contenant de forte concentration (4 M) d'urée pour dénaturer et déployer les protéines par rupture des ponts hydrogènes impliqués dans sa conformation. Cependant, de fortes concentrations d'urée peuvent aller à l'encontre des résultats d'une analyse nano-LC MS/MS. Nous avons donc évalué l'impact de la dilution de l'échantillon peptidique afin de trouver un compromis entre les quantités d'urée et de peptide injectées dans la colonne de chromatographie. Le compromis trouvé est une dilution de l'échantillon digéré au minimum de $\frac{1}{4}$ (afin d'obtenir une concentration finale d'urée inférieure à 1 M). Par la suite, le marquage s'effectuant sur 60 μg de protéine, les échantillons peptidiques (9,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) seront dilués au $\frac{1}{7^{\text{e}}}$ puis 1,5 μl sera injecté en nano-LC, correspondant à environ 2 μg de peptides injectés ;

- le gradient d'élution employé pour la séparation de peptides est également impliqué dans le pouvoir de séparation d'un système chromatographique. Nous avons donc testé trois gradients chromatographiques d'ACN différents : un gradient court (de 93 min) permettant de raccourcir considérablement le temps d'analyse d'un *run* nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS, et deux gradients longs (200 min). En effet, contrairement au couplage de chromatographie liquide avec des sources électrospray, l'analyse *off-line* MALDI-TOF/TOF-MS nécessite un temps d'analyse beaucoup plus considérable. En contrepartie, la séparation chromatographique étant figée sur cible MALDI, il est toujours possible de ré-analyser un ou plusieurs spots après analyse. Le premier gradient de 200 min est en tout point identique à celui de la stratégie *label free* présentée dans le chapitre précédent. Le deuxième gradient de 200 min (où la fenêtre de gradient pendant laquelle la quasi-totalité des peptides sont élués est allongée de 40 minutes (gradient linéaire de 120 min pour celui de la stratégie *label free*, gradient linéaire de 160 minutes pour ce nouveau gradient)) fût celui qui nous a permis d'obtenir le maximum de peptides quantifiés (de 5 % à 18,5 % d'ACN sur 10 min, de 18,5 % à 59 % sur 170 min, de 59 % à 86 % sur 9 min et de 86 % à 5 % sur 10 min) ;

- pour finir, nous avons évalué un paramètre relatif aux mesures en masse, en l'occurrence la composition de la matrice de dépôt qui est ajoutée au cours de l'élution des peptides. Nous avons comparé la matrice habituellement utilisée au laboratoire pour l'analyse de mélanges peptidiques complexes (0,33 mg/ml de CHCA dans acétone : éthanol : 0,1 % acide trifluoroacétique (TFA) (3 : 6 : 1 ; v/v/v)) avec celle reportée dans la note d'application ICPL de Bruker Daltonics (Resemann *et al.*, 2010). Cette matrice, présentant la composition suivante : 95 % ACN : CHCA saturé dans 90 % ACN : 10 % TFA : 100 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (9,35 : 4,5 : 1 : 1 ; v/v/v/v), n'a cependant pas donné de meilleurs résultats.

1.3. Stratégie employée

Mis à part l'étape de quantification, le protocole expérimental employé (Figure 31) est identique à celui utilisé lors de l'approche sans marquage (*label free*), afin d'obtenir des résultats parfaitement comparables.

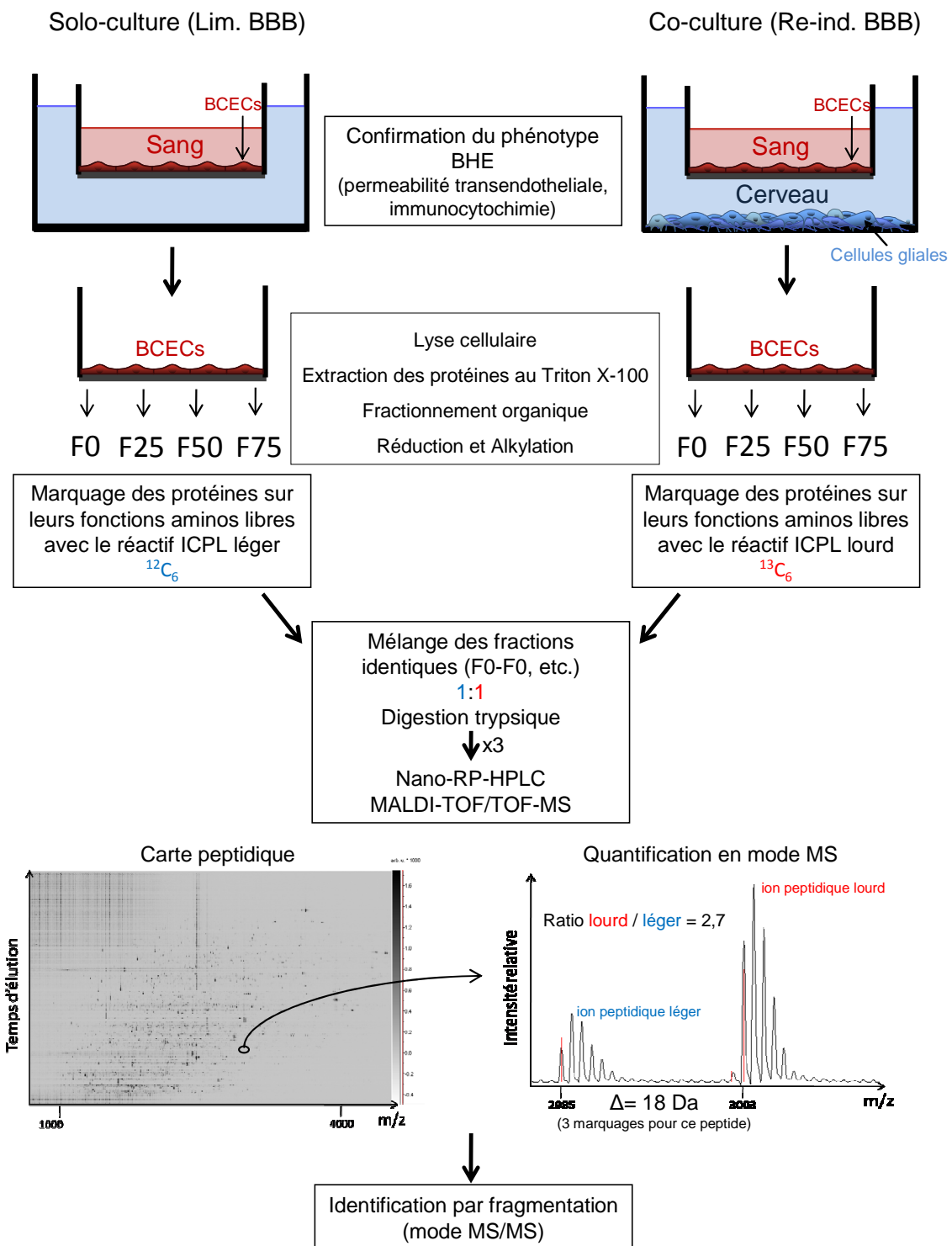


Figure 31 : Schéma illustrant la stratégie protéomique ICPL (isotope-coded protein label).

Les BCECs des deux conditions cellulaires à comparer (solo-culture, Lim. BBB et co-culture, Re-ind. BBB) sont lysées en tampon Triton X-100. Les protéines sont extraites et fractionnées selon le protocole mis en place lors de l'approche sans marquage. La stratégie ICPL consiste à marquer les protéines fractionnées sur leurs fonctions amine libres à l'aide du réactif ICPL léger pour la condition Lim. BBB et du réactif ICPL lourd pour la condition Re-ind. BBB. Les fractions de même nature sont alors combinées (F0-Lim. BBB avec F0-Re-ind. BBB, etc.) puis les protéines sont soumises à une protéolyse trypsique en présence d'urée (4 M) suivie d'une analyse par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS. La quantification des protéines se fait à l'aide du mode MS alors que l'identification nécessite la fragmentation des peptides en mode MS/MS. Les analyses nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS sont effectuées trois fois (réplicats techniques).

2. Analyse par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS des hydrolysats tryptiques des fractions

2.1. Cartes peptidiques

La comparaison des cartes peptidiques issues de l'analyse ICPL par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS nous permet de détecter les couples de peptides présentant une différence de masse de 6, 12 ou 18 Da (exemples entourés en rouge, pour ce dernier cas, dans la Figure 32). Les couples correspondant au marquage d'un peptide sur un ou deux sites possèdent une différence de masse non visualisable à l'échelle de cette figure.

Une différence de profil, cette fois-ci peptidique, est observée entre la fraction F0 et les autres fractions. Par exemple, les encadrés bleu de la Figure 32 montrent que pour chaque fraction, mis à part pour la fraction F0, quasiment aucun composés de rapport de m/z supérieur à 3000 Da n'a été détectés pendant les 40 premières minutes d'élution (jusqu'au spectre numéro 80).

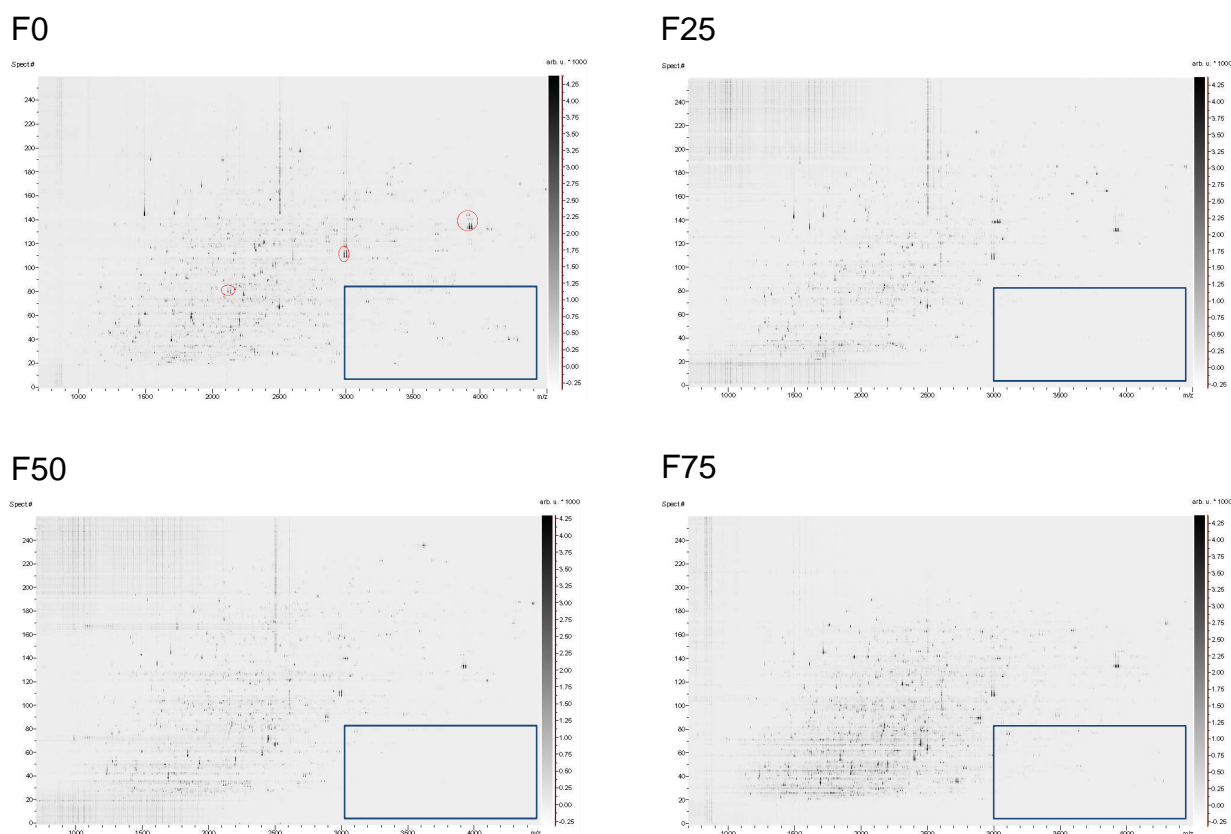


Figure 32 : Cartes peptidiques obtenues (stratégie ICPL).

Cartes peptidiques générées après analyses ICPL en nano-LC MALDI-TOF-MS des différentes fractions (F0 à F75) issues des BCECs solo et co-cultivées. L'axe des ordonnées correspond au temps de rétention chromatographique (exprimé par le nombre de spectre (Spect #) correspondant aux différents spectres MS des 260 premiers dépôts chromatographiques (sur 380)). L'axe des abscisses reprend le ratio de m/z des ions peptidiques détectés. L'abondance du signal peptidique est codé par une échelle de gris (représentée à droite des cartes peptidiques), plus le signal est important plus il apparaîtra foncé. Des exemples de couples peptidiques ayant une différence de masse de 18 Da sont entourés en rouges. Les encadrés bleus montrent la zone d'élution des peptides de m/z supérieur à 3000 Da et élués pendant les 40 premières minutes.

2.2. Homogénéité des données de spectrométrie de masse

Comme indiqué par les histogrammes de la Figure 33, le nombre de composés détectés, de même que le nombre de fragmentations (MS/MS) réalisées, ne diffèrent pas de manière significative d'une fraction à l'autre. En moyenne, de 10094 à 12349 composés sont détectés (principalement des peptides) selon la fraction (Figure 33 A) dont environ 21 % (plus de 2000 peptides) ont été fragmentés (Figure 33 B). Parmi ces peptides fragmentés, 42,1 % ($\pm 3,7$) non pas été identifiés.

Les listes de protéines identifiées sont établies sur la base des recommandations de la communauté internationale dans le domaine de la protéomique en incluant cependant les protéines identifiées avec un peptide unique mais spécifique d'une seule protéine. Le pourcentage de faux positifs (FDR) relatif aux identifications sous Mascot a été calculé avec l'option *decoy* et est estimé à moins de 2 % pour toutes les analyses. Le pouvoir discriminant de la technique d'identification des protéines par PFF permet d'identifier en moyenne environ 140 à 180 protéines pour chaque fraction (Figure 33 C). Afin d'évaluer les informations quantitatives fournies par ces analyses, un seuil de significativité (déterminant si la protéine peut être considérée comme sur-exprimée ou non) a été établi à 1,3. En d'autres termes, nous considérons qu'une protéine possède une différence d'expression significative entre les deux conditions cellulaires si son facteur de régulation est supérieur ou égal à 1,3. Une protéine qui ne présente pas de variation quantitative biologiquement significative possède un facteur de régulation compris entre 1 et 1,3. Ce seuil de significativité (fixé à 30 %) permet de nous affranchir des variabilités techniques conduisant à des erreurs de quantification estimées à 14 % avec le marquage du mélange de 6 protéines.

Comme démontré par les écarts-type calculés et reportés dans la Figure 33, les mesures de masse tout comme celles des identifications de protéines (incluant le nombre de protéines non quantifiées, le nombre de protéines sur-exprimées dans l'une ou l'autre des deux conditions et le nombre de protéines ne présentant pas de variation d'expression) sont reproductibles et homogènes entre les fractions et les séries expérimentales.

A l'issue des analyses effectuées par la stratégie *label free*, la Figure 33 D montre que le pourcentage de protéines identifiées, en analyse MALDI-TOF/TOF-MS, avec un seul peptide est élevé (36 %). Parallèlement, le pourcentage de protéines quantifiées avec un seul peptide est lui aussi élevé (52 %). En conséquence, l'élimination de ces protéines lors du traitement des identifications aurait engendré une perte d'information non négligeable.

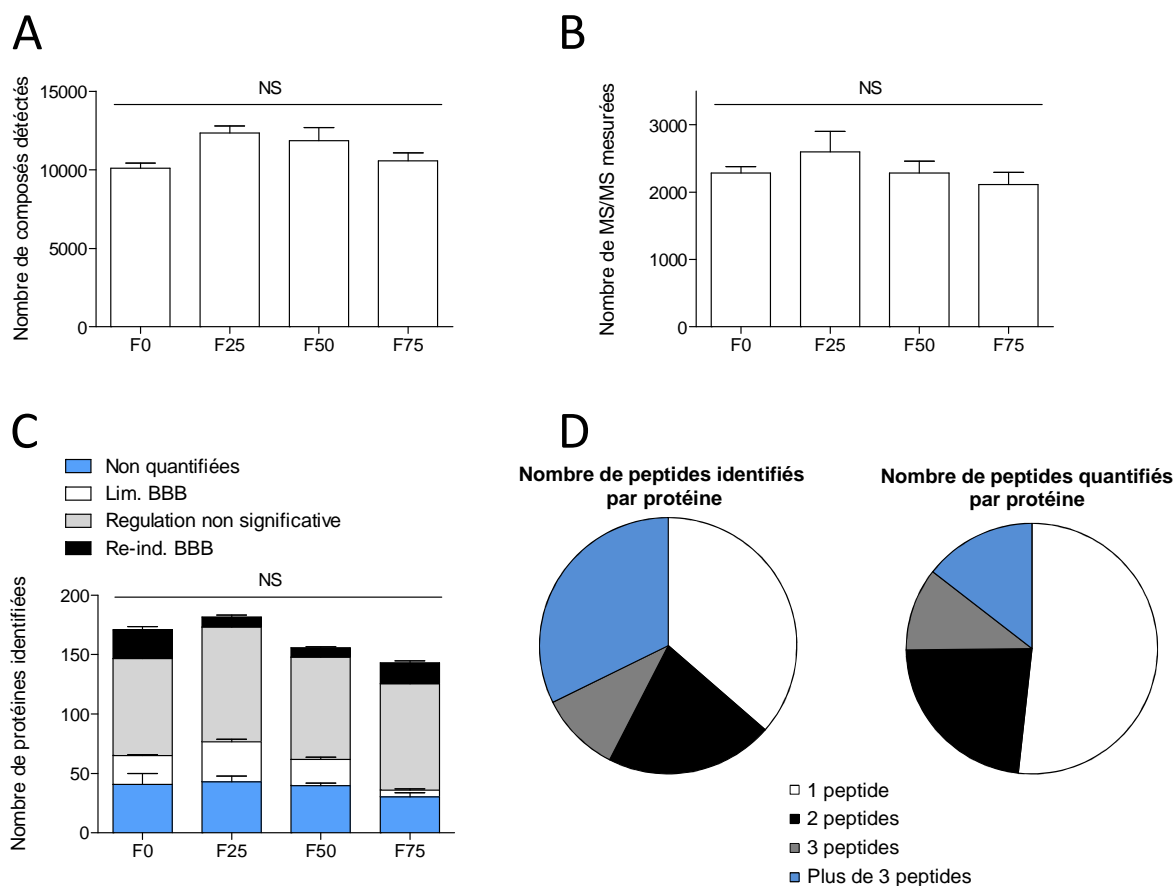


Figure 33 : Évaluation de l'homogénéité des données de masses (stratégie ICPL).

Panneaux A, B et C : histogrammes comparatifs par fraction du nombre de composés détectés (A), du nombre de fragmentations mesurées (B) et du nombre de protéines identifiées (C) lors de l'analyse ICPL par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS. Les protéines fractionnées sont extraites au Triton X-100 des BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) et co-cultivées (Re-ind. BBB). La nature des protéines identifiées est divisée en quatre parties : (i) les protéines sur-exprimées au sein des BCECs co-cultivées (en noir), (ii) les protéines ne présentant pas de variation quantitative entre les deux conditions cellulaires (en gris), (iii) les protéines sur-exprimées au sein des BCECs solo-cultivées (en blanc) et (iv) les protéines identifiées mais non quantifiées (en bleu). Le tri et l'analyse croisée des listes de protéines ont été réalisés avec le logiciel nwCompare. L'analyse statistique, quant à elle, a été réalisée avec le logiciel PRISM 5. Les données correspondent à la moyenne \pm SEM des trois séries expérimentales. NS : non-significatif (test de *Tukey* et analyse de la variance à un facteur). (D) Nombre de peptides identifiés ou quantifiés par protéine *via* la stratégie ICPL.

2.3. Analyse globale des identifications et de la quantification

Le tri et l'analyse croisée des identifications conduisent à l'identification d'un total de 412 protéines. La Figure 34 A montre la répartition, selon leur localisation cellulaire, de ces 412 protéines identifiées. Plus de 80 % des protéines identifiées sont des protéines cytoplasmiques (intracellulaires (GO : 0005622) ou localisées au sein de complexes ribonucléoprotéiques (GO : 0030529)), 14,2 % font partie de complexes protéiques (GO : 0043234) (qui peuvent se trouver au sein de la membrane plasmique ou à l'intérieur de la cellule) et 3,2 % sont des protéines

extracellulaires (GO : 0005615). La Figure 34 B montre, quant à elle, leur répartition selon les procédés biologiques dans lesquels elles sont impliquées. Environ 50 % d'entre elles sont impliquées dans les processus métaboliques et cellulaires (GO : 0008152 \approx 36 % ; GO : 0009987 \approx 14 %), 9 % dans le transport (GO : 0006810) et 7 % dans l'organisation des composants cellulaires (GO : 0016043).

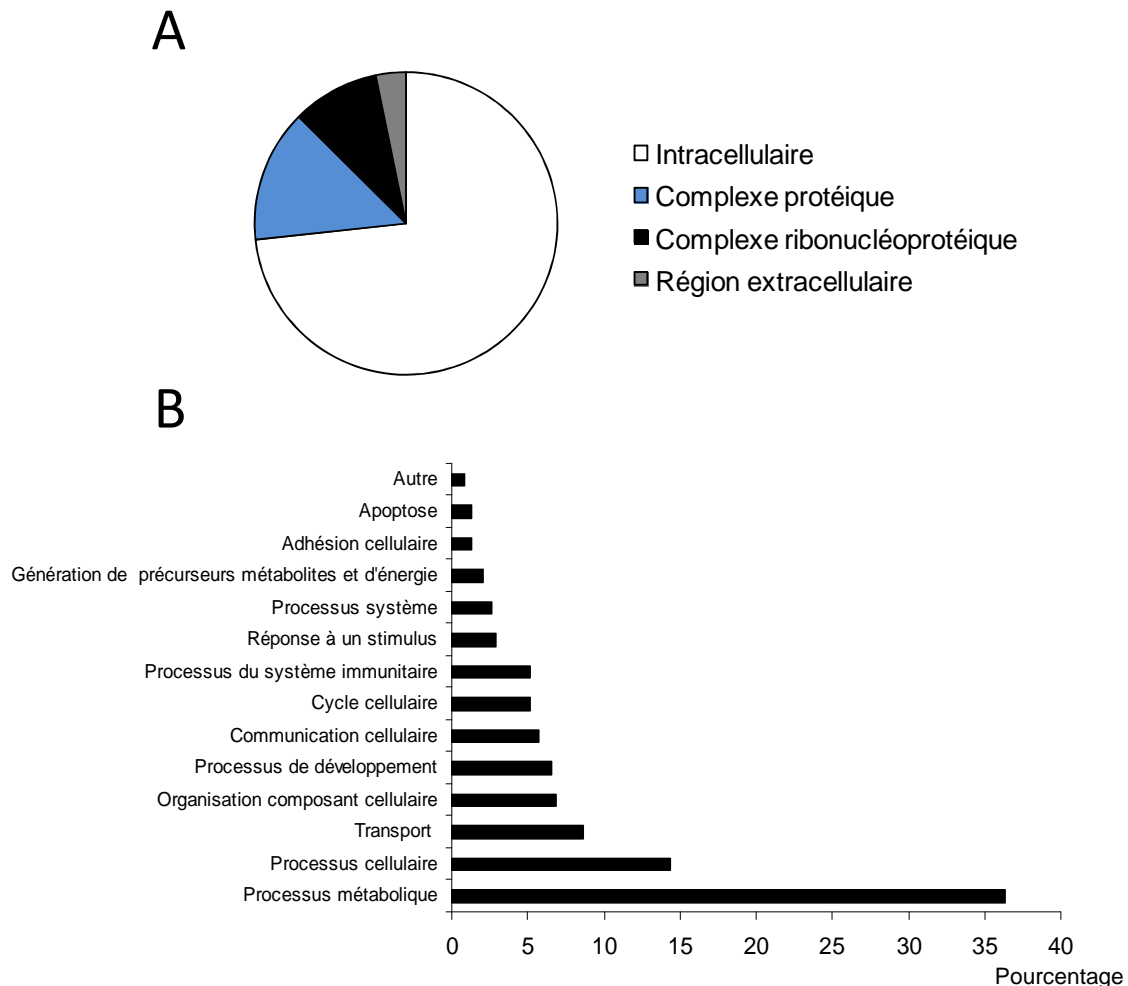


Figure 34 : Classification des 412 protéines identifiées (stratégie ICPL).

Classification des 412 protéines identifiées (A) selon leur localisation cellulaire (composant cellulaire) et (B) selon les procédés biologiques dans lesquels elles sont impliquées. Classification effectuée grâce au système de classification PANTHER.

L'analyse des données de quantification ICPL par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS issues de cette étude différentielle entre les BCECs solo-cultivées ou co-cultivées montre que 290 protéines ont été quantifiées (Figure 35). 73 % des protéines quantifiées ne présentent pas de variation quantitative biologiquement significative (facteur de régulation compris entre 1 et 1,3). Cependant, 27 % de ces protéines quantifiées montrent une différence d'expression significative entre les deux conditions (facteur de régulation supérieur ou égal à 1,3). Un total de 47 protéines et 34 protéines sont ainsi retrouvées sur-exprimées respectivement au sein des

BCECs solo-cultivées et co-cultivées. Les facteurs de régulation sont compris entre 1 et 5,91 mais la grande majorité (281 / 290) n'excèdent pas 2.

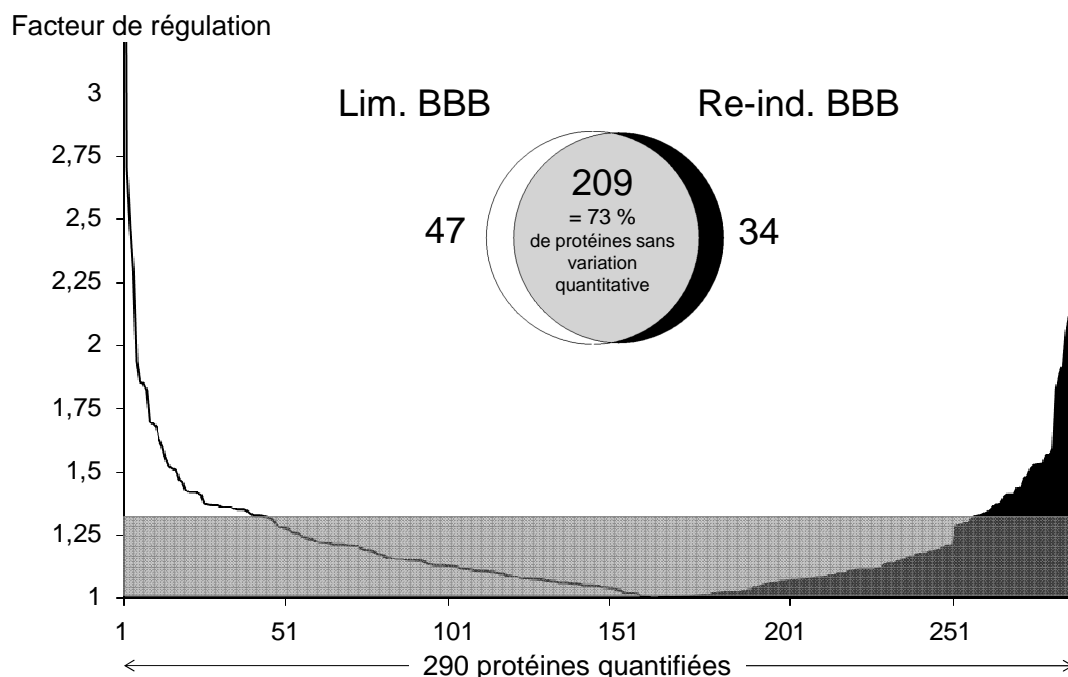


Figure 35 : Évaluation globale du nombre de protéines quantifiées.

L'analyse globale des réplicats expérimentaux des différentes fractions montre que 290 protéines ont été quantifiées grâce à la stratégie ICPL. Les protéines ayant un facteur de régulation significatif (supérieur à 1,3) sont indiquées en blanc ou noir pour respectivement les protéines sur-exprimées au sein des BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) (47) ou co-cultivées (Re-ind. BBB) (34). Les protéines possédant un facteur de régulation non significatif (entre 1 et 1,3) entre les deux conditions cellulaires comparées sont indiquées en gris (209). Les ratios correspondent à Lim. BBB / Re-ind. BBB pour la condition Lim. BBB et à 1/ (Lim. BBB / Re-ind. BBB) pour la condition Re-ind. BBB. Le tri et l'analyse croisée des listes de protéines ont été réalisés avec le logiciel nwCompare.

Les protéines sur-exprimées en solo-culture (47 protéines, en jaune) et en co-culture (34 protéines, en bleu) sont répertoriées dans le Tableau VII. Fait intéressant, les deux protéines possédant les facteurs de régulation les plus élevés sont respectivement le facteur de von Willebrand, marqueur endothélial, sur-exprimé en co-culture (facteur de régulation de 3,14) et la kératine du cytosquelette de type II, dont la provenance par contamination n'est pas à exclure, sur-exprimée en solo-culture (facteur de régulation de 5,91). Seules 7 autres protéines possèdent un facteur de régulation supérieur à 2. Quatre d'entre elles sont sur-exprimées en co-culture : le récepteur de stéroïdes, *membrane-associated progesterone receptor component 2* ; la purine nucléoside phosphorylase, déjà identifiée sur-exprimée par approche 2D-DIGE et liée à la voie de méthylation des protéines (boucle de régulation ADMA, DDAH, Arg et eNOS) ; l'adénine phosphorybosyltransférase, enzyme également impliquée dans le métabolisme des purines et la ribonucléoprotéine, *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C*. Les trois dernières

sont sur-exprimées en solo-culture : la transgeline, protéine de liaison au cytosquelette ; la phospholipase putative PLBL2 et l'enzyme impliquée dans la synthèse des acides aminés, l'ornithine aminotransférase. Ces protéines tendent à confirmer que la ré-induction du phénotype BHE au sein des BCECs semble, entre autres, (i) dépendre de la machinerie cellulaire pour la régulation de l'expression des gènes ainsi que pour la production et la régulation des protéines et (ii) impliquer des protéines du cytosquelette.

Les facteurs de régulation des protéines reportés dans le tableau correspondent pour chaque protéine à la moyenne des facteurs de régulation calculés pour chaque fraction et réplicat. La carte de chaleur représentée à droite du tableau permet de mettre en évidence, en fonction des fractions, les facteurs de régulation de ces protéines sur-exprimées dans les BCECs co-cultivées (sur-expression en co-culture indiquée en bleu) et solo-cultivées (sur-expression en solo-culture indiquée en jaune). Les zones grisées, correspondant à des facteurs de régulation non significatifs, sont plus fréquentes lorsque l'on se rapproche de notre seuil de non significativité (1,3). Ceci peut s'expliquer par (i) un biais expérimental (par exemple au niveau des étapes de préparation des échantillons), dans ce cas-là notre estimation de 30 % d'erreur ne serait pas suffisante ou (ii) une différence de solubilité de la protéine entre les deux conditions cellulaires en raison de propriétés physico-chimiques différentes. En effet, une protéine peut porter une MPT exclusivement dans l'une des deux conditions et ne sera alors pas solubilisée de la même façon lors du fractionnement comparativement à sa forme non modifiée. Cette hypothèse reste à confirmer.

Tableau VII : Liste des protéines quantifiées avec un facteur de régulation significatif (supérieur à 1,3) entre les BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) ou co-cultivées (Re-ind. BBB).

Nom de la protéine	Accession Swiss-Prot	Gene name	Masse moléculaire (Da)	Point isoélectrique	Nombre de fraction	Nombre de peptide fragmenté	Nombre de peptide quantifié	Score d'identification ^a	Couverture de séquence (%)	Facteur de régulation	Déviat standard	Upregulée en	F0	F25	F50	F75
von Willebrand factor (Fragment)	VWF_BOVIN	VWF	102 500	5.3	5	1	1	55,4	2,6	3,14	0,08	Re-ind. BBB				
Membrane-associated progesterone receptor component 2	PGR2_HUMAN	PGRMC2	23 800	4.6	1	1	1	70,2	6,7	2,22		Re-ind. BBB				
Purine nucleoside phosphorylase	PNPH_BOVIN	PNP	32 000	5.9	12	8	2	612	43,3	2,20	0,06	Re-ind. BBB				
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (Fragment)	HNRPC_RAT	HNRPC	18 000	10.2	1	1	1	56,2	14,6	2,13		Re-ind. BBB				
Adenine phosphoribosyltransferase	APT_BOVIN	APRT	19 500	9.1	9	3	1	142,7	36,7	2,06	0,08	Re-ind. BBB				
D-dopachrome decarboxylase	DOPD_BOVIN	DDT	12 900	7.6	2	2	1	56,2	12,7	1,92	0,07	Re-ind. BBB				
U2 small nuclear ribonucleoprotein B''	RU2B_HUMAN	SNRPB2	25 500	10.1	1	1	1	37,9	8,0	1,89		Re-ind. BBB				
Myosin-9	MYH9_CANFA	MYH9	226 400	5.4	7	4	2	335,7	2,1	1,83	0,07	Re-ind. BBB				
Protein S100-A4	S10A4_BOVIN	S100A4	11 800	5.8	7	1	1	50,9	8,9	1,59	0,08	Re-ind. BBB				
Elongation factor 1-gamma	EF1G_BOVIN	EEF1G	50 300	6.1	6	2	1	203,2	8,2	1,56		Re-ind. BBB				
Sorcin	SORCN_HUMAN	SRI	21 700	5.2	1	1	1	51,8	9,6	1,56		Re-ind. BBB				
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	AL9A1_BOVIN	ALDH9A1	53 900	5.8	3	1	1	44,6	4,3	1,53	0,03	Re-ind. BBB				
Keratin, type II cytoskeletal 80	K2C80_BOVIN	KRT80	47 400	5.1	3	2	1	55,8	4,7	1,53	0,26	Re-ind. BBB				
Ras-related protein Ral-B	RALB_MACFA	RALB	23 400	6.3	5	5	3	174,4	29,6	1,53	0,08	Re-ind. BBB				
Gelsolin	GELS_BOVIN	GSN	80 700	5.5	2	1	1	86,3	1,6	1,53	0,04	Re-ind. BBB				
Protein DJ-1	PARK7_BOVIN	PARK7	20 000	7.7	3	3	2	88,4	22,2	1,52	0,06	Re-ind. BBB				
Membrane-associated progesterone receptor component 1	PGR1_BOVIN	PGRMC1	21 600	4.4	6	3	2	115,3	16,0	1,48	0,13	Re-ind. BBB				
60S acidic ribosomal protein P0	RLA0_BOVIN	RPLP0	34 300	5.6	1	1	1	40	5	1,47		Re-ind. BBB				
Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	EMAL4_MOUSE	Em4	110 000	6.1	3	2	1	77,3	2,0	1,44	0,05	Re-ind. BBB				
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_BOVIN	PEBP1	21 000	7.7	3	2	1	103,6	11,8	1,44	0,03	Re-ind. BBB				
Apolipoprotein A-I	APOA1_BOVIN	APOA1	30 300	5.6	1	1	1	46	8,3	1,41		Re-ind. BBB				
Barrier-to-autointegration factor	BAF_BOVIN	BAF	10 100	5.8	4	3	2	214,8	75,3	1,41	0,07	Re-ind. BBB				
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_BOVIN	SOD1	15 700	5.9	2	2	1	123,5	23,7	1,41	0,03	Re-ind. BBB				
Keratin, type II cytoskeletal 73	K2C73_MOUSE	Krt73	60 300	9.1	4	1	1	55,7	3,6	1,40	0,15	Re-ind. BBB				
Prelamin-A/C	LMNA_MOUSE	LMNA	74 200	6.6	6	9	5	422,1	15,8	1,38	0,10	Re-ind. BBB				
Polymerase I and transcript release factor	PTRF_HUMAN	PTRF	43 400	5.4	9	6	3	243,1	9,7	1,37	0,17	Re-ind. BBB				
GTP-binding protein SAR1a	SAR1A_BOVIN	SAR1A	22 400	6.2	1	1	1	35,8	11,6	1,35		Re-ind. BBB				
Glutathione S-transferase P	GSTP1_BOVIN	GSTP1	23 600	7.7	9	5	1	238,8	29	1,34	0,13	Re-ind. BBB				
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_BOVIN	PGK1	44 500	9.3	12	11	5	614,6	28,3	1,33	0,14	Re-ind. BBB				
Ras-related protein Ral-A	RALA_HUMAN	RALA	23 600	7.5	3	3	2	114	18,9	1,37	0,04	Re-ind. BBB				
NADH-cytochrome b5 reductase 3	NB5R3_BOVIN	CYB5R3	34 100	7.0	6	2	1	124	13,3	1,33	0,07	Re-ind. BBB				
60S ribosomal protein L29	RL29_BOVIN	RPL29	16 800	12.4	3	3	2	127,5	23	1,32	0,22	Re-ind. BBB				
Phosphoglycerate kinase 2	PGK2_MOUSE	PGK2	44 900	9.2	9	2	1	130	4,8	1,32	0,21	Re-ind. BBB				
Histone H2A type 4	H2A4_RAT	TH2A	14 300	11.5	1	2	1	132,9	15,4	1,32		Re-ind. BBB				
40S ribosomal protein S24	RS24_BOVIN	RPS24	15 200	11.4	6	4	3	176,3	39,7	1,31	0,19	Lim. BBB				
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	ARP5L_BOVIN	ARPC5L	16 900	6.2	3	1	1	50,6	17	1,32	0,14	Lim. BBB				
BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain BL3-6	HA1A_BOVIN		40 300	5.3	8	2	1	98,5	3,3	1,32		Lim. BBB				
S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	MTAP_BOVIN	MTAP	31 200	7.9	3	2	1	67,6	4,6	1,32	0,09	Lim. BBB				
Ezrin	EZRL_BOVIN	EZR	68 700	6.0	8	4	2	215,8	7,2	1,33	0,27	Lim. BBB				
60S ribosomal protein L15	RL15_BOVIN	RPL15	24 100	12.2	3	4	3	178,4	20,6	1,33	0,22	Lim. BBB				

<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	TPM1_BOVIN	TPM1	32 700	4.5	7	3	1	250,3	12	1,33	0,25	Lim. BBB	
<i>Coactosin-like protein</i>	COTL1_BOVIN	COTL1	16 000	4.9	12	4	2	263,2	31	1,33	0,16	Lim. BBB	
<i>ATPase inhibitor, mitochondrial</i>	ATIF1_BOVIN	ATPIF1	12 300	9.9	2	2	1	66,9	22,9	1,35	0,29	Lim. BBB	
<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B</i>	AN32B_BOVIN	ANP32B	29 900	3.8	1	1	1	49,1	6,9	1,35		Lim. BBB	
<i>Ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>	RL40_BOVIN	UBA52	14 700	10.7	1	3	2	226,7	23,4	1,35		Lim. BBB	
<i>Serine/threonine-protein kinase TAO3</i>	TAOK3_HUMAN	TAOK3	105 300	6.9	1	1	1	37	0,7	1,35		Lim. BBB	
<i>Heat shock protein beta-1</i>	HSPB1_BOVIN	HSPB1	22 400	6.0	10	3	1	315,5	29,9	1,35	0,26	Lim. BBB	
<i>Nucleosome assembly protein 1-like 1</i>	NP1L1_BOVIN	NAP1L1	45 300	4.2	2	2	1	105	11,3	1,36	0,10	Lim. BBB	
<i>26S protease regulatory subunit 6B</i>	PRS6B_BOVIN	PSMC4	47 300	5.0	4	2	1	127,6	13,2	1,36	0,35	Lim. BBB	
<i>60S ribosomal protein L27</i>	RL27_BOVIN	RPL27	15 800	11.0	6	7	3	269,4	45,6	1,36	0,39	Lim. BBB	
<i>Annexin A3</i>	ANXA3_BOVIN	ANXA3	36 100	6.6	9	8	5	350	26	1,36	0,17	Lim. BBB	
<i>DNA-binding protein A</i>	DBPA_MOUSE	DBPA	38 800	10.0	1	2	1	149	5,5	1,37		Lim. BBB	
<i>Histone H3.2</i>	H32_BOVIN	H3.2	15 400	11.9	3	9	5	469,7	65,4	1,37	0,12	Lim. BBB	
<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	GRP78_BOVIN	GRP78	72 400	4.9	12	13	7	532,7	24,4	1,37	0,18	Lim. BBB	
<i>Annexin A5</i>	ANXA5_BOVIN	ANXA5	36 100	4.7	11	10	5	521,8	38,6	1,37	0,31	Lim. BBB	
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7</i>	PSD7_BOVIN	PSMD7	36 700	6.3	4	2	1	72,9	5,3	1,38	0,13	Lim. BBB	
<i>Moesin</i>	MOES_BOVIN	MSN	67 900	5.8	12	22	13	1155,1	39	1,41	0,17	Lim. BBB	
<i>Cathepsin D</i>	CATD_BOVIN	CATD	42 500	6.7	3	4	3	211,7	20,5	1,41	0,06	Lim. BBB	
<i>Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>	MANF_BOVIN	MANF	20 300	9.7	1	1	1	37,1	10,1	1,42		Lim. BBB	
<i>40S ribosomal protein S10</i>	RS10_BOVIN	RPS10	18 900	10.5	11	3	2	214,4	29,7	1,42	0,11	Lim. BBB	
<i>Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial</i>	SUCA_BOVIN	SUCA	36 100	10.2	1	1	1	39,4	8,4	1,42		Lim. BBB	
<i>Tubulin alpha-3E chain</i>	TBA3E_HUMAN	TUBA3E	49 800	4.9	1	5	1	358,7	15,8	1,43		Lim. BBB	
<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>	TPM4_HORSE	TPM4	28 500	4.5	2	8	4	444,6	29,4	1,46	0,40	Lim. BBB	
<i>Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial</i>	COX5A_BOVIN	COX5A	16 700	6.5	6	3	2	114,7	25,7	1,47	0,26	Lim. BBB	
<i>Calumenin</i>	CALU_BOVIN	CALU	37 100	4.3	1	1	1	76,3	8,3	1,51		Lim. BBB	
<i>Proteasome subunit alpha type-7</i>	PSA7_BOVIN	PSMA7	27 900	9.3	3	1	1	118,3	8,5	1,52	0,04	Lim. BBB	
<i>Tropomyosin beta chain</i>	TPM2_BOVIN	TPM2	32 800	4.5	10	5	2	312	14,4	1,52	0,17	Lim. BBB	
<i>Prothymosin alpha</i>	PTMA_BOVIN	PTMA	12 100	3.5	3	2	1	141,2	47,3	1,55		Lim. BBB	
<i>Serpin H1</i>	SERPH_BOVIN	SERPINH1	46 500	9.5	10	6	3	395,9	18,4	1,60	0,22	Lim. BBB	
<i>N-acetylglucosamine-6-sulfatase</i>	GNS_BOVIN	GNS	62 700	9.5	2	3	2	82,6	5,5	1,63	0,01	Lim. BBB	
<i>Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial</i>	IDH3A_BOVIN	IDH3A	39 600	6.9	4	1	1	87,4	8,7	1,68	0,05	Lim. BBB	
<i>Cytochrome c oxidase subunit 6B1</i>	CX6B1_BOVIN	COX6B1	10 100	9.8	3	2	1	68,8	19,8	1,69	0,62	Lim. BBB	
<i>Cytoskeleton-associated protein 4</i>	CKAP4_HUMAN	CKAP4	63 700	5.4	9	2	1	101,9	4,7	1,70	0,31	Lim. BBB	
<i>Plastin-3</i>	PLST_BOVIN	PLS3	70 800	5.3	4	1	1	109,6	3	1,82	0,19	Lim. BBB	
<i>Integrin beta-1</i>	ITB1_BOVIN	ITGB1	88 000	5.2	6	5	2	240,2	7,6	1,85	0,38	Lim. BBB	
<i>60S ribosomal protein L30</i>	RL30_BOVIN	RPL30	12 800	10.2	4	4	1	115,2	28,7	1,86	0,58	Lim. BBB	
<i>Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2</i>	P4HA2_MOUSE	P4HA2	61 000	5.5	2	1	1	62,7	4,1	1,94		Lim. BBB	
<i>Transgelin</i>	TAGL_BOVIN	TAGL	22 600	9.4	9	6	4	351,9	44,8	2,30	0,40	Lim. BBB	
<i>Putative phospholipase B-like 2</i>	PLBL2_BOVIN	PLBD2	65 700	9.2	2	1	1	101,9	2,4	2,48	0,25	Lim. BBB	
<i>Ornithine aminotransferase, mitochondrial</i>	OAT_BOVIN	OAT	48 000	6.1	1	1	1	37,9	5,9	2,70		Lim. BBB	
<i>Keratin, type II cytoskeletal 72</i>	K2C72_MOUSE	Krt72	56 700	7.8	1	1	1	35,7	3,8	5,91		Lim. BBB	

Les protéines sont classées selon leur facteur de régulation. Celui-ci correspond à la moyenne des différentes fractions (F0 à F75) et des séries expérimentales.

^a Score d'identification : la relevance des identités protéiques est jugée par le *probability-based molecular weight search score* (calculé avec $p < 0,05$). Le seuil de significativité des scores d'ions correspond à la valeur de 35. Sur la droite du tableau se trouve « une carte de chaleur » représentant la pertinence du facteur de régulation selon le fractionnement. Les protéines sur-exprimées dans les BCECs co-cultivées sont indiquées en bleu (haut du tableau) et celles sur-exprimées dans les BCECs solo-cultivées sont indiquées en jaunes (bas du tableau). Les zones grises correspondent à des protéines quantifiées avec un facteur de régulation non significatif. Les zones blanches signifient que la protéine n'a pas été quantifiée dans la fraction correspondante.

La classification, selon leur fonction moléculaire (Figure 36), des protéines sur-exprimées dans les BCECs issues des deux conditions de culture montre qu'environ 82 % d'entre elles, aussi bien pour la condition solo-culture que la condition co-culture, ont une fonction de liaison (GO : 0005488, Lim. BBB \approx 27 %, Re-ind. BBB \approx 33 %), une fonction catalytique (GO : 0003824, Lim. BBB \approx 25 %, Re-ind. BBB \approx 30 %) ou une fonction structurale (GO : 0005198, Lim. BBB \approx 30 %, Re-ind. BBB \approx 19 %).

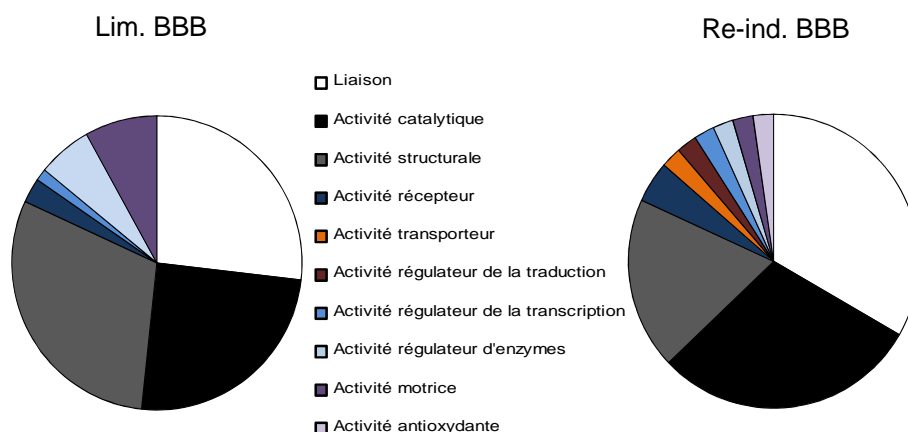


Figure 36 : Classification, selon leur fonction moléculaire, des protéines sur-exprimées dans les BCECs solo-cultivées (Lim. BBB, 47 protéines) ou co-cultivées (Re-ind. BBB, 34 protéines). Classification effectuée grâce au système de classification PANTHER.

3. Validation biochimique de deux protéines d'intérêt : la superoxyde dismutase 1 (SODC) et la protéine DJ-1

Afin de valider notre stratégie ICPL, nous avons voulu valider la sur-expression de deux protéines parmi celles sur-exprimées en co-culture : la superoxyde dismutase 1 (SODC, facteur de régulation de 1,41 (\pm 0,03)) et la protéine DJ-1 (homologue 7 de la protéine de la maladie de Parkinson, PARK7, facteur de régulation de 1,52 (\pm 0,06)). Ces deux protéines sont pour nous d'intérêt pour leur implication dans le stress oxydatif des BCECs. Comme montré par la banque de donnée STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*, (Szklarczyk *et al.*, 2011)), ces deux protéines semblent être associées (sur la base de données expérimentales) (Figure 37). Leur sur-expression dans les BCECs co-cultivées a été statistiquement validée par western blot. Ainsi, l'expression des protéines dans cette condition est augmentée de 1,66 fois pour la SODC et de 1,39 fois pour la DJ-1 en comparaison aux BCECs solo-cultivées.

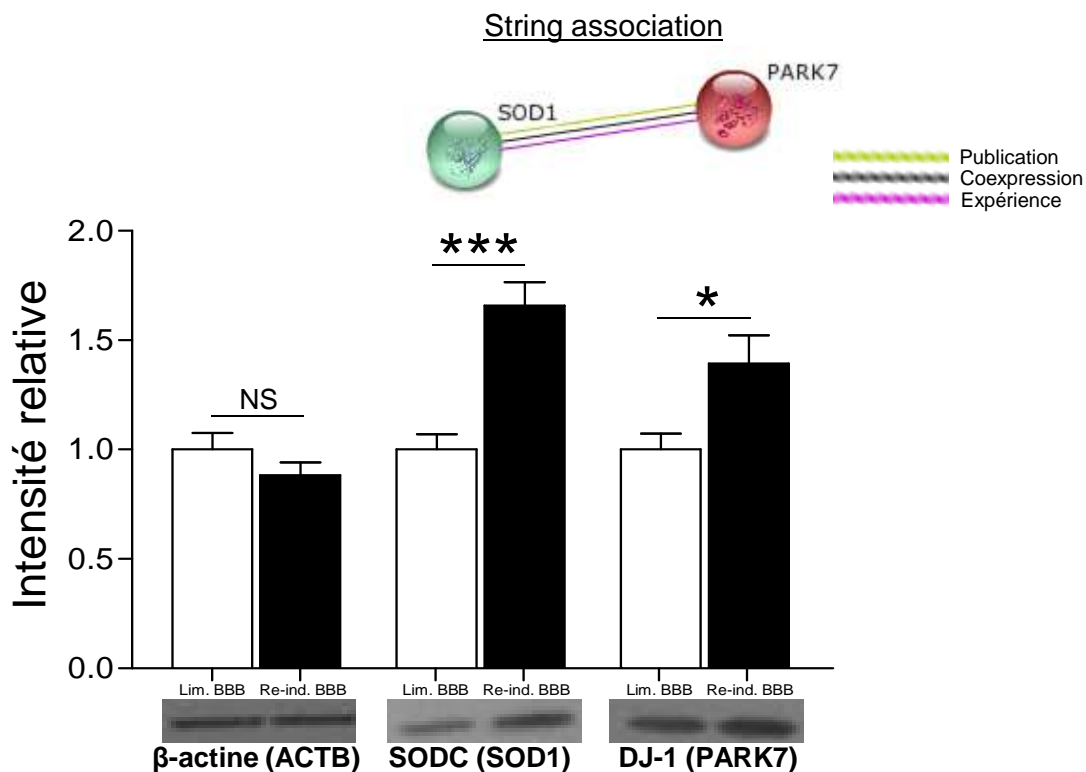


Figure 37 : Validation biochimique de la sur-expression de la superoxyde dismutase, SODC et de la protéine DJ-1 dans les BCECs co-cultivées.

Analyse par western blot du taux protéique de β -actine, DJ-1 et SODC dans les BCECs solo-cultivées (Lim. BBB) ou co-cultivées (Re-ind. BBB). Les analyses quantitatives et statistiques ont été réalisées avec respectivement les logiciels TotalLab 100 et PRISM 5. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM des analyses effectuées sur cinq lots cellulaires différents. *** $p < 0,0009$; * $p < 0,0279$; NS : non significatif (*unpaired t-test*). L'expression de la β -actine a été utilisée comme contrôle qualité des échantillons. L'anticorps monoclonal anti-DJ-1 et l'anticorps polyclonal anti-SODC proviennent d'Abcam (Paris, France). Les anticorps sont utilisés à une dilution de $1/20000^{\circ}$, 30 min pour anti-DJ-1 et de $1/3000^{\circ}$, une nuit à 4°C pour anti-SODC. DJ-1 et PARK7, homologue 7 de la protéine de la maladie de Parkinson ; SODC et SOD1, superoxyde dismutase 1.

4. Discussion

4.1. Analyses ICPL nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS

De la même façon que pour la stratégie sans marquage, nous avons analysé la localisation cellulaire des protéines identifiées par stratégie ICPL. Plus de 80 % des protéines identifiées sont cytoplasmiques montrant une nouvelle fois l'enrichissement en protéines cytosoliques par extraction au Triton X-100.

Environ 6800 composés sont détectés par fraction dans le cadre de la stratégie *label free* contre 11200 composés pour la stratégie ICPL. Cette différence de composés détectés ne semble cependant pas aberrante. En effet, la stratégie ICPL consiste à analyser un mélange, provenant de deux conditions définies, de peptides de protéines différenciellement marquées (les peptides non marqués sont identiques d'une condition à l'autre, en revanche les peptides

marqués donneront au minimum un signal dédoublé par spectrométrie de masse). Il semble donc cohérent de détecter et de fragmenter un nombre plus important de composés par fraction lors des approches ICPL en comparaison des approches *label free*.

Les performances de la stratégie ICPL ont été rapportées par plusieurs travaux. Pour n'en citer que quelques-uns, Tebbe et collaborateurs ont identifié, par analyse MALDI-TOF/TOF-MS, 1020 protéines de la bactérie *Halobacterium salinarum* dont 712 ont été quantifiées à la suite de conditions de croissance distinctes (Tebbe *et al.*, 2009). Turtoi et collaborateurs ont identifié, par analyse électrospray-IT-MS, 211 protéines du sérum humain déplété en protéines abondantes dont 128 ont été quantifiées par comparaison de deux groupes de patients (Turtoi *et al.*, 2010). L'étude de tissus cérébraux de patients sains et atteints de schizophrénie a conduit à l'identification, par analyse MALDI-TOF/TOF-MS, de 479 (lobe temporal antérieur) et 1261 (cortex préfrontal dorsolatéral) protéines cérébrales humaines dont 37 et 84, respectivement, ont été détectées comme présentant une différence d'expression (Maccarrone *et al.*, 2010). Par une stratégie de marquage inverse d'une lignée de cellules épithéliales humaines transfectées ou non, Colomé et collaborateurs identifient, par analyse électrospray-IT-MS, respectivement 565 et 606 protéines (marquage inverse) dont 149 et 98 sont différentiellement exprimées d'une condition à l'autre (Colomé *et al.*, 2010). Récemment, Com et collaborateurs rapportent l'identification, par analyse électrospray-IT-MS, de 584 protéines issues de régions distinctes de glioblastomes humains. Parmi celles-ci, 259 protéines ont été quantifiées (Com *et al.*, 2012). La stratégie par marquage ICPL est donc un outil puissant, précis et reproductible pour la quantification et l'identification de centaines de protéines provenant de mélange complexe (Kellermann, 2008; Papaioannou *et al.*, 2010). La société Bruker Daltonics démontre que l'erreur d'identification générale n'est que de 5 % si au moins 4 paires de peptides sont détectées (Suckau *et al.*, 2006).

L'identification d'une protéine est considérée comme valide si 2 paires de peptides sont détectées laissant cependant la qualité d'analyse et la validation des données affectées (Suckau *et al.*, 2006). Dans notre étude, un certain nombre de protéines sont identifiées et/ou quantifiées avec un seul peptide. Certains auteurs valident manuellement les protéines identifiées et quantifiées avec 1 seul peptide considérant que l'absence de coupure au niveau des lysines génère, certes une diminution du nombre de peptides, mais des peptides plus long permettant d'obtenir une couverture de séquence suffisante pour réduire les problèmes d'interférence d'identification (Papaioannou *et al.*, 2010; Tebbe *et al.*, 2009). Pour pallier ce problème, deux solutions sont cependant proposées : augmenter la fenêtre de scan m/z lors d'une ionisation MALDI, c'est-à-dire régler le spectromètre de masse pour détecter les ions peptidiques de rapport de m/z plus élevé que 3500 ou utiliser une seconde enzyme de digestion. La première solution engendre néanmoins une augmentation du temps d'analyse (déjà conséquent) non négligeable. N'ayant pas réussi à mettre au point la double digestion

enzymatique, nous avons donc pris parti de considérer les protéines identifiées et/ou quantifiées avec un seul peptide.

4.2. Identifications protéiques

Parmi toutes les protéines quantifiées et sur-exprimées dans l'une ou l'autre des deux conditions cellulaires, deux d'entre elles, induites par les cellules gliales et connues pour leur propriété antioxydante, ont particulièrement attiré notre attention : la superoxyde dismutase, SODC et la protéine DJ-1. L'activité antioxydante est connue pour être une caractéristique de la BHE.

En conditions physiologiques, une balance entre la formation (réduction des molécules d'oxygène principalement pendant le transport mitochondrial d'électrons) et l'élimination (par des enzymes antioxydantes telles que la SOD, les catalases ou la glutathione peroxydase) des espèces réactives d'oxygène (ROS) (entre autres, anion superoxyde, $O_2^{\cdot-}$; radical hydroxyle, OH^{\cdot} ; peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 et ion peroxydite, $ONOO^-$) est maintenue à l'équilibre. Quelle que soit son origine, le stress oxydatif correspond au déséquilibre de cette balance et conduit à l'augmentation des concentrations des ROS (production excessive de ROS ou diminution de l'activité des enzymes antioxydantes). Ce déséquilibre est la cause des dommages oxydatifs subits par les cellules. Les ROS, molécules à très hautes réactivité, vont oxyder les lipides (perturbation des membranes), les protéines (perte de fonction), les acides nucléiques (mutations génétiques) ou encore les sucres. Ces modifications moléculaires peuvent induire au niveau des capillaires cérébraux une ouverture de la BHE puis la mort cellulaire (Al Ahmad *et al.*, 2012).

Les taux de ROS augmentent progressivement avec le vieillissement cellulaire. Cependant, ces taux sont excessivement augmentés dans plusieurs conditions pathologiques où leurs effets « toxiques » contribuent à la pathogénicité de certaines maladies telles que l'athérosclérose, les infarctus du myocarde, l'ischémie cérébrale, les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique) ou encore lors de conditions inflammatoires (Dalle-Donne *et al.*, 2006; de Vries *et al.*, 2008; Maier and Chan, 2002; Smith *et al.*, 1998).

Dans le cerveau, les astrocytes jouent, entre autres, un rôle de protection des neurones vis-à-vis du stress oxydatif (Aschner, 1998; Desagher *et al.*, 1996) notamment par leur fort potentiel antioxydant. Il est maintenant reconnu que les astrocytes ont également la capacité d'induire une activité antioxydante au niveau des BCECs qui participe à la protection de la BHE vis-à-vis du stress oxydatif (Schroeter *et al.*, 1999).

Dans cette étude, nous montrons que l'expression de deux protéines antioxydantes (SODC et DJ-1) est induite au niveau des BCECs par les cellules gliales. Notons également

que la glutathione S-transférase P est retrouvée dans la liste des protéines sur-exprimées au sein des BCECs co-cultivées (facteur de régulation de 1,34 (\pm 0,13)). Cette protéine est une enzyme impliquée dans la détoxification des xénobiotiques mais également dans la protection des dommages oxydatifs.

La superoxyde dismutase 1 (SODC)

La SOD est une enzyme (EC 1.15.1.1) qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène (2 anions superoxydes ($2\text{O}_2^{\cdot-}$) + 2H^+ = O_2 + H_2O_2). Trois isoformes de la SOD existent (pour revue Fukai and Ushio-Fukai, 2011). La SOD1 est une forme dimérique contenant du cuivre et du zinc, largement distribuée dans le cytosol, le noyau et l'espace intermembranaire mitochondrial (elle est également appelée SODC). Elle va permettre la destruction des radicaux libres normalement produit à l'intérieur de la cellule et toxique pour les systèmes biologiques. La SOD2 est une forme tétramérique, contenant du manganèse, distribuée dans la matrice mitochondriale et la paroi interne des mitochondries (SODM). Elle est capable de protéger la cellule du stress oxydatif provoqué lors de la respiration cellulaire. La SOD3 est une forme tétramérique extracellulaire contenant également du cuivre et du zinc (SODE). Elle est capable de se lier à la surface de la cellule ou au niveau du collagène extracellulaire afin de protéger la cellule du stress oxydatif extracellulaire.

L'expression de la SODC ainsi que celle de l'oxyde nitrique synthase (eNOS) ont été détectées comme augmentées dans des CEs soumises à des conditions de culture faisant intervenir des contraintes de cisaillement en comparaison à un modèle de culture statique (Inoue *et al.*, 1996; Uematsu *et al.*, 1995). NO^{\cdot} a une demi vie très courte qui semble être modulée par la production de $\text{O}_2^{\cdot-}$. La libération de NO^{\cdot} est dépendante de la SODC.

En raison de facteurs multiples comme le vieillissement progressif des populations, la maladie d'Alzheimer est devenue la forme de démence la plus commune (environ 70 % des cas de démences). Il est estimé qu'elle touche une personne sur vingt âgée de plus de 65 ans. Elle représente la quatrième cause de mortalité en France (après les cancers, les maladies cardiovasculaires et les décès non pathologiques). Plus de 160 000 nouveaux cas sont dénombrés par an en France. Les principales caractéristiques neuropathologiques de cette maladie reposent sur trois types de lésions : les plaques séniles (accumulation extracellulaire principalement constituée de peptide β -amyloïde ($\text{A}\beta$)), les dégénérescences neurofibrillaires (neurofibrilles intracellulaires de protéine tau hyperphosphorylée) et l'atrophie corticale. Cette maladie se traduit par une dégénérescence neuronale responsable d'une perte progressive des fonctions cognitives. Parmi les nombreuses stratégies envisagées pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (Brambilla *et al.*, 2011), l'une consiste à délivrer dans le cerveau des molécules antioxydantes afin de limiter l'activité des ROS. Une étude *in vitro*, basée sur

l'encapsulation de la SOD dans des nanoparticules (dans l'optique d'augmenter sa concentration cérébrale) a montré que cette stratégie permettait de protéger les cellules neuronales humaines contre le stress oxydatif induit par H₂O₂ (Reddy *et al.*, 2008).

La DJ-1 (PARK7)

La DJ-1 est une protéine dimérique localisée au niveau du cytoplasme, du noyau et des mitochondries. Elle fonctionne comme une protéine chaperonne mais possède également une activité catalase, protéase, kinase et antioxydante (par l'élimination du peroxyde d'hydrogène) pour la protection de la cellule vis-à-vis du stress oxydatif. Elle est largement exprimée dans le cerveau et certain tissu périphérique. Cette protéine est impliquée dans un nombre élevé de maladie (maladie de Parkinson, lésions ischémiques, cancers, sclérose latérale amyotrophique) et est connue comme une protéine multifonctionnelle.

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative causée par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire. Il est estimé que cette maladie touche une personne sur cent âgée de plus de 50 ans. Cette maladie se caractérise par la formation de corps de Lewy par l'accumulation d'une protéine sous forme de fibres : l' α -syncléine (Pieri *et al.*, 2012). 5 à 10 % des cas de cette maladie sont d'ordres génétiques, dont le gène *PARK7* fut le premier gène impliqué identifié. Par son rôle de chaperonne, la DJ-1 permettrait d'inhiber l'agrégation de l' α -syncléine (Shendelman *et al.*, 2004). Un stress oxydatif élevé ainsi qu'une dysfonction mitochondriale sont également associée à cette maladie. La mutation du gène *PARK7* serait ainsi liée au stress oxydatif élevé de la maladie. L'oxydation de la cystéine 106 serait une MPT très importante de la DJ-1 qui pourrait agir comme « détecteur » de stress oxydatif. Le clivage C-terminal de DJ-1 permet l'activation de son activité protéase. Cette activité protéase pourrait jouer un rôle dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif (Chen *et al.*, 2010). DJ-1 possède également un rôle de co-activateur de nombreux facteurs de transcription en séquestrant leurs facteurs d'inhibition (Clements *et al.*, 2006). Elle permettrait l'activation de la transcription de la NAD(P)H quinone oxydoréductase 1, enzyme de détoxication. Le traitement de souris avec du bisphénol A, un inducteur des ROS, induit une translocation de la DJ-1 dans les mitochondries afin de maintenir l'activité du complexe I mitochondrial (Takahashi-Niki *et al.*, 2012).

Nous avons validé grâce à cette étude (par une approche protéomique puis par western blot) la sur-expression protéique de ces deux enzymes au sein des BCECs cultivées en présence de cellules gliales. Le dosage de l'activité de la SODC est envisagé ainsi que son inhibition par du diéthylthiocarbamate. L'implication de ces deux enzymes dans la BHE est également envisagée par la technique d'ARN interférents.

La supplémentation en antioxydants connaît un véritable engouement scientifique pour la lutte contre de nombreuses pathologies. Ces enzymes pourraient être exploitées comme des cibles de traitements : augmenter leur expression (ou lever leur inhibition) pourrait être une stratégie afin d'augmenter la réponse antioxydative dans diverses pathologies.

Contrairement aux stratégies de quantification en « gel » dans lesquelles l'identification des protéines est focalisée sur les protéines différentielles, la stratégie ICPL permet d'obtenir des informations quant aux protéines non différentiellement exprimées. Mise au point lors de cette seconde étude, elle nous a permis de quantifier 50 protéines différentiellement exprimées entre les BCECs solo-cultivées ou co-cultivées. Parmi elle, 34 sont induites par la présence des cellules gliales. La ré-induction du phénotype BHE au sein des BCECs semble ainsi dépendre, entre autres, de la machinerie cellulaire pour la régulation de l'expression des gènes ainsi que pour la production et la régulation des protéines.

Bien que cette propriété ne soit pas nouvelle, nous démontrons ici que l'activité antioxydante des BCECs peut être considérée comme une caractéristique importante du phénotype BHE. Les cellules gliales jouent un rôle primordial pour la protection du compartiment cérébral vis-à-vis des molécules oxydantes. Elles vont agir directement sur les cellules cérébrales mais aussi directement au niveau de la BHE, où le contrôle des échanges sang-cerveau est strictement régulé. La BHE doit faire face au paradoxe de l'oxygène : il est nécessaire pour un bon fonctionnement cérébral mais peut devenir toxique. Cette dernière doit alors posséder les mécanismes cellulaires lui permettant d'éviter les dommages irréversibles dus à l'oxygène (fluctuation des concentrations sanguines d'oxygène) tout en permettant son transport.

Annexe 3 : Communication affichée

Analyse comparative du sous-protéome cytoplasmique de la barrière hémato-encéphalique : approche sans marquage et approche par marquage isotopique stable.

Deracinois B, Cecchelli R, Flahaut C, Karamanos Y.

*Congrès de la Société Française d'Électrophorèse et d'Analyse Protéomique (SFEAP),
15-17 octobre 2012, Rouen, France.*

Comparative analysis of the blood-brain barrier endothelial cells cytoplasmic sub-proteome : label free and stable isotope labeling approaches



Barbara DERACINOIS^{1,2,3}, Roméo CECHELLI^{1,2,3}, Christophe FLAHAUT^{1,2,3} and Yannis KARAMANOS^{1,2,3}

¹Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France; ²Université d'Artois, LBHE, F-62300 Lens, France; ³IMPRT-IFR114, F-59000 Lille, France

Introduction

The blood-brain barrier (BBB) control the para- and transcellular crossing of compounds from blood to brain (and inversely) and establish the « gatekeepers » of the brain. The major part of therapeutic drugs developed to fight the brain diseases is deemed inefficient *in vivo* due to the existence of the BBB that they are unable to cross. Although relatively well known in its physiological aspect, the BBB phenotype of brain capillary endothelial cells (BCECs) remains largely under known and misunderstood in regards of the molecular mechanisms that govern its establishment and its maintenance. To this goal, using the *in vitro* BBB model developed in the laboratory (co-culture of bovine BCECs with rat glial cells), we performed two differential proteomic studies to **identify the main cytoplasmic proteins involved in the establishment and maintenance of this phenotype**: a qualitative label free approach and a quantitative isotope coded protein labeling (ICPL) approach.

Material and methods

BCECs that have lost some BBB functions (solo-culture) or not (co-culture) were produced using a differentiated culture model (Fig. 1). The BBB phenotype was checked by measuring of the endothelial permeability and by immunostaining directed against tight junction proteins, such as occludin and claudin-5 (data not shown). BCECs, from solo-culture or co-culture, were collected by collagenase treatment and lysed by a Triton X-100 containing TRIS-buffer. Because the protein heterogeneity of the Triton X-100 protein fraction annihilated the efficacy of fragmentation in mass spectrometry, the samples were sub-fractionated according to their hydrophobicity using a discontinuous acetonitrile gradient (Fig. 2). After tryptic digestion, each sub-fraction was subjected to off line 1D-nano liquid chromatography and mass spectrometry analysis (nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS). The “label free” approach consists of a “simple” analysis of the identified proteins (Fig. 4). As for it, the second approach by ICPL consists of the quantification of proteins by a previous isotopic labeling (Fig. 5).

Fig. 1: BBB *in vitro* model

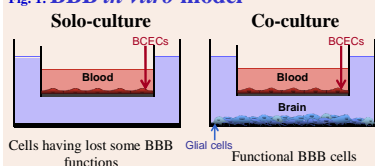
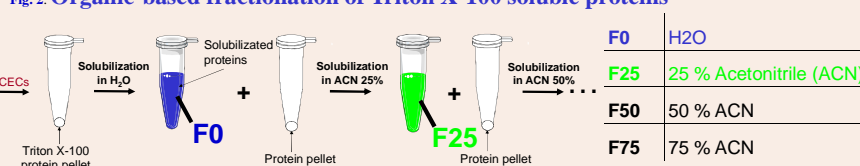


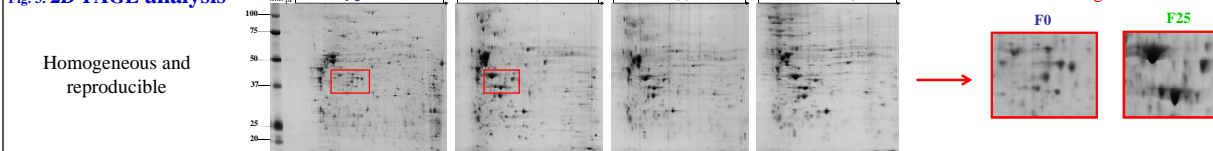
Fig. 2: Organic-based fractionation of Triton X-100 soluble proteins



Appraisal of the efficiency of the organic fractionation

The efficiency of the sub-fractionation, its homogeneity and its reproducibility were investigated by 1D-PAGE (data not shown) and 2D-PAGE analysis. The organic-phase partitioning of proteins is above all marked between the F0 and F25 fractions.

Fig. 3: 2D-PAGE analysis



“Label free” approach N=3

Fig. 4a: Common and specific proteins

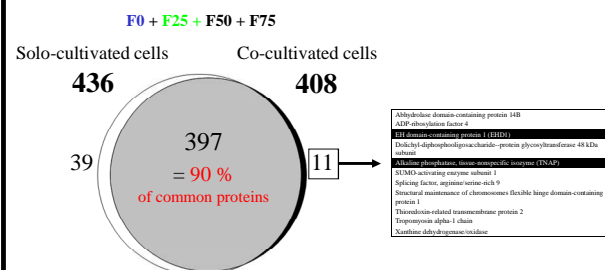


Fig. 4b: Immunocytochemistry of EHD1 and TNAP

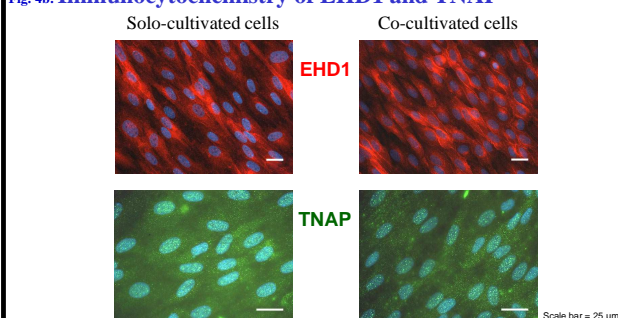
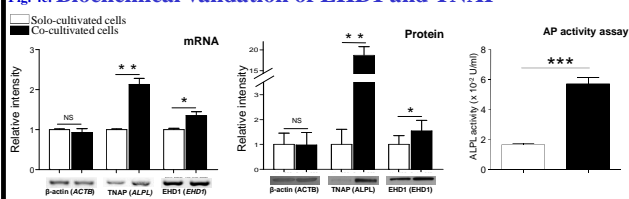


Fig. 4c: Biochemical validation of EHD1 and TNAP



Isotope Coded Protein Label (ICPL) approach n=3

Fig. 5a: ICPL labeling principle

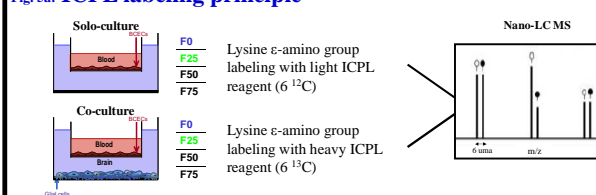


Fig. 5b: Proteins distribution according to their regulation factor

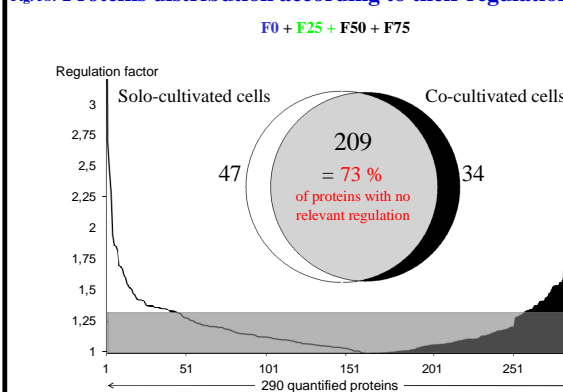
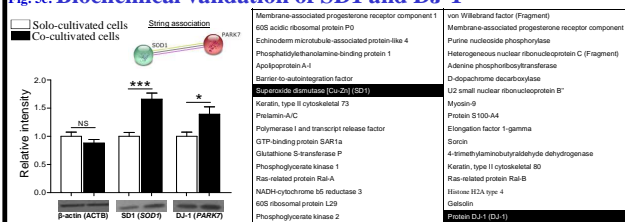


Fig. 5c: Biochemical validation of SD1 and DJ-1



Conclusions

The two different approaches, label free and ICPL were complementary and permitted the identification of numerous proteins, some of them being of particular interest for BBB. For the label free approach, 447 proteins in total were identified (168 not yet described in previous reports). Among them, 11 proteins are specifically identified in co-cultured BCECs, and 39 proteins in solo-culture (Fig. 4a). The ICPL approach resulted to the identification of 412 proteins (161 new, compared to the label free approach and previous reports). Among the 290 quantified proteins, 34 were up-regulated and 47 down-regulated in co-cultured BCECs (Fig. 5b). Four proteins of particular interest for BBB (tissue-non specific alkaline phosphatase, TNAP; Eps15 homology domain containing protein 1, EHD1; superoxide dismutase, SODC and DJ-1 protein, PARK7) were more deeply studied and open future prospects for potential cellular pathways induced by glial cells and involved in the BBB phenotype (Fig. 4c and Fig. 5c).

Discussion

Localisée à l'interface sang-cerveau, la BHE joue un double rôle physiologique : elle assure la protection du cerveau vis-à-vis des importantes variations quantitatives des molécules circulantes du sang mais aussi de composés potentiellement toxiques (fonction de barrière) tout en permettant le transport des nutriments vers le cerveau et l'élimination des métabolites vers le sang (fonction de transporteur).

Le phénotype BHE des BCECs, bien caractérisé sur le plan physiologique, reste encore mal connu sur le plan moléculaire, même si la composition et les relations protéine-protéine au sein de la membrane plasmique sont les mieux décrites (Ohtsuki and Terasaki, 2007). En effet, de par leur localisation privilégiée, les protéines de la membrane plasmique des BCECs sont très vite devenues l'axe de recherche majeur de bon nombre de groupe de recherche. Les connaissances dans ce domaine sont d'ailleurs très importantes sur la période de ces 10 dernières années, d'autant que l'engouement et la motivation de chacun étaient guidés par l'attrait de la découverte rapide de protéines cibles de la membrane plasmique capables de véhiculer les médicaments vers le cerveau. A notre connaissance, les stratégies d'adressage des médicaments vers le cerveau reposent toujours actuellement sur l'utilisation de cibles protéiques découvertes il y a plus de 20 ans telles que le récepteur de la transferrine, de l'insuline ou des LDLs.

Nous avons pris le parti de tenter de décrypter les mécanismes moléculaires qui régissent l'induction (ou plus précisément la ré-induction) et le maintien des propriétés de BHE au sein de BCECs. Si le nombre de nouveaux cas par an de personnes atteintes de maladies neurodégénératives ne cessent d'augmenter, d'autres pathologies comme les accidents vasculaires cérébraux restent la troisième cause de mortalité et la première et deuxième cause respectivement de séquelles moteurs irréversibles et de démences. Dès lors, comprendre les mécanismes fondamentaux d'induction des propriétés de BHE nous semble rester une question d'actualité. Pour ce faire, la détection des messagers moléculaires de la cellule impliqués dans ce phénotype passe par une identification moléculaire des modifications qualitatives et quantitatives affectant les protéines de la BCEC.

Le but de notre étude était de mettre en évidence, par une approche protéomique différentielle, les acteurs protéiques du cytosol potentiellement responsables de l'établissement et du maintien de ce phénotype. Impossible *in vivo*, cette démarche globale requiert une approche *in vitro* basée sur l'utilisation d'un modèle de culture cellulaire le plus physiologiquement proche du phénotype BHE. Les cellules gliales sont reconnues comme des acteurs principaux d'induction des propriétés de barrière au sein des BCECs (Abbott *et al.*, 2006). Mis au point dans les années 1990, le modèle *in vitro* de co-culture développé au laboratoire (BCECs bovines cultivées en présence de cellules gliales) est un modèle de choix permettant d'obtenir en grande quantité (ce qui présente un avantage important pour une étude protéomique) des BCECs au phénotype de BHE. Dès lors, la détection des protéines

cytoplasmiques d'intérêt repose sur l'analyse différentielle de sous-protéomes enrichis en protéines cytosoliques grâce à l'utilisation d'un détergent doux (le Triton X-100, 1 %) à partir de BCECs co-cultivées ou non.

1. Notre stratégie protéomique

A partir du modèle *in vitro* non syngénique (boeuf / rat) développé et caractérisé au laboratoire, plusieurs outils protéomiques (principalement la 2D-PAGE) ont été utilisés ces dernières années. **Ce travail de thèse est basé sur une stratégie *shotgun* complémentaire par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS.**

La séparation chromatographique à une dimension des peptides issus des protéines de BCECs solubilisées par le Triton X-100, suivie de leur analyse par MALDI-TOF/TOF-MS ont été infructueuses. En effet, en raison d'une très importante hétérogénéité peptidique de ces extraits, seules quelques protéines majoritaires ont pu être identifiées. La simplification de nos extraits protéiques a ainsi été une étape nécessaire pour notre approche protéomique « hors gel ». Le fractionnement organique que nous avons choisi nous permet de réduire très simplement, et de façon reproductible, l'hétérogénéité protéique de nos échantillons, engendrant un minimum de perte de matériel tout en restant compatible avec les analyses par chromatographie et spectrométrie de masse.

Les protocoles expérimentaux de nos deux stratégies nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS (*label free* et ICPL) ont été rigoureusement les mêmes, mis à part l'étape supplémentaire de marquage des protéines pour la stratégie ICPL. De manière assez intéressante, seul 37 % des identifications sont communes. Ce chiffre tend à démontrer que les deux stratégies sont complémentaires (Figure 39 A) mais nous oblige également à la prudence car la logique voudrait que ce pourcentage soit plus important. Ce pourcentage s'explique en partie par les propriétés des marqueurs ICPL utilisés qui permettent une amplification du signal en mode MS, les peptides marqués auront donc un signal en masse plus imposant (au détriment des peptides non marqués), avec une conséquence directe sur leur détection et leur fragmentation. Inversement, une certaine proportion de ces signaux moins abondants obtenus par stratégie *label free* ne sera pas forcément suffisante pour être détectée et/ou fragmentée. De même, le marquage ICPL permet d'affirmer que les ions fragmentés en mode MS/MS sont différents de ceux de l'approche large sans marquage puisque les couples d'ions léger/lourd sont prioritairement et informatiquement recherchés pour être soumis à fragmentation. Les peptides détectés ne sont donc définitivement pas les mêmes entre la stratégie *label free* et ICPL permettant l'identification de protéines différentes. Pour preuve, bien que cette constatation ne soit démontrée ici que sur la base d'une des protéines majeures de la cellule (la vimentine), la Figure 38 B montre que les peptides identifiés sont bien différents selon la stratégie employée.

Il faut néanmoins noter que l'enzyme protéolytique à également une part de responsabilité dans cet état de fait.

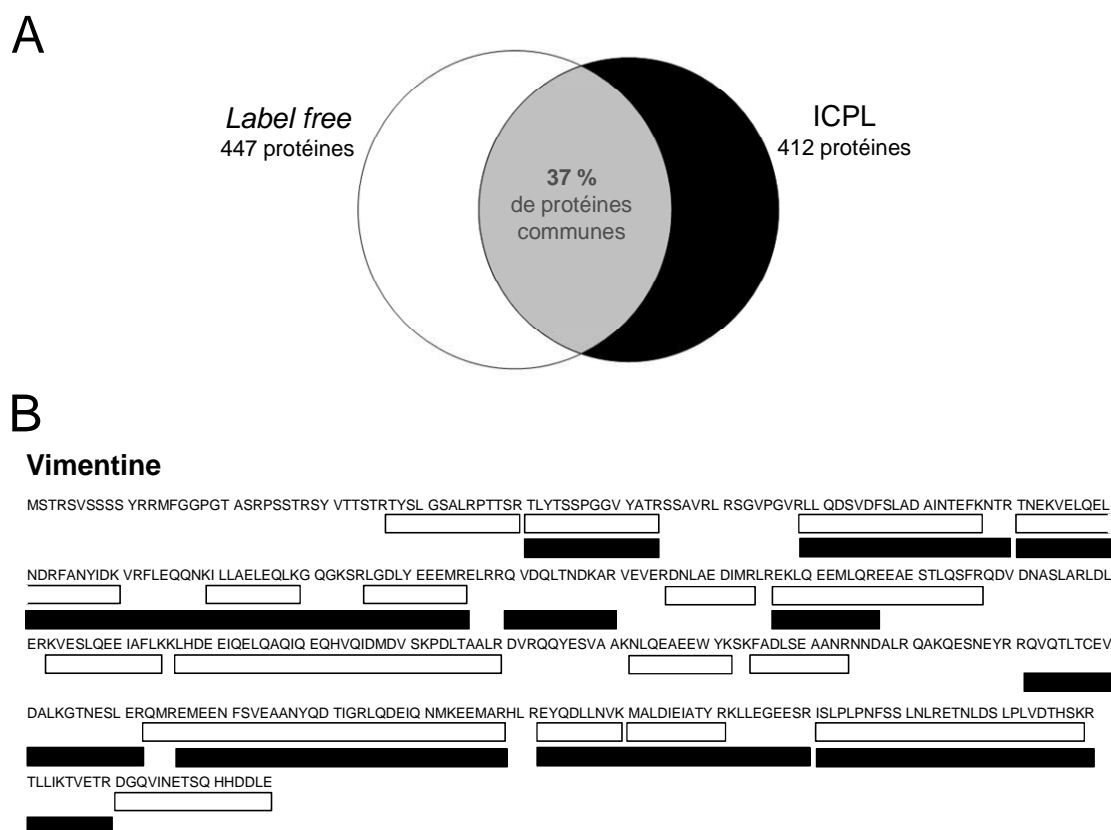


Figure 38 : Comparaison des stratégies (*label free* versus ICPL) employées.

(A) Diagramme de Venn du nombre de protéines identifiées en *label free* et/ou ICPL. (B) Comparaison de la couverture de séquence (par visualisation des peptides détectés et fragmentés) de la vimentine identifiée par approches *label free* (encadrés blanc) et ICPL (encadrés noir). ICPL, *isotope-coded protein label*.

Au total, 631 protéines ont été identifiées (si l'on combine les deux stratégies utilisées, *label free* et ICPL) par nano-LC MALDI-TOF/TOF-MS. Le nombre de protéines identifiées et quantifiées peut paraître faible comparé à certaines publications récentes concernant l'analyse de protéomes complexes où plus de 1000 protéines sont identifiées (Gokce *et al.*, 2012; Kroksveen *et al.*, 2012; Wiśniewski *et al.*, 2012). Cependant, ce nombre nous paraît cohérent en raison du type de spectromètre de masse utilisé dans notre approche (MALDI-TOF/TOF) comparée à celles qui utilisent un type de spectrométrie de masse totalement différent (Orbitrap, ionisation électrospray, tri des ions par trappe ionique, etc.). En moyenne, sur toutes les fragmentations (MS/MS) programmées, 49,9 % ($\pm 10,0$) et 42,1 % ($\pm 3,7$) (respectivement pour les analyses *label free* et ICPL) n'aboutissent pas à une identification. Ce pourcentage assez élevé peut s'expliquer (i) par un échec de la fragmentation en masse, (ii) par un spectre de fragmentation de qualité spectrale insuffisante, (iii) par la présence d'une MPT sur le peptide fragmenté non prise en compte lors de la recherche en banque de données ou (iv) par le fait

que le peptide, malgré un spectre de fragmentation correct, ne soit pas retrouvé dans la banque de données, même par homologie à d'autres espèces. Le génome bovin a en effet été entièrement séquencé en 2006 mais n'est pas entièrement annoté (Zimin *et al.*, 2009). Bien évidemment, il est possible d'augmenter encore le nombre de protéines identifiées grâce à l'utilisation d'un spectromètre de masse plus performant, possédant une meilleure sensibilité, résolution et précision de mesure. Les analyses de la fraction totale des protéines extraites au Triton X-100 ont été réalisées en collaboration avec le Dr Luc CAMOIN (Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, U891 INSERM ; Université de la Méditerranée, Marseille, France) sur un appareil Orbitrap. Néanmoins, nos attentes ne sont pas d'accroître la « déjà très longue liste » des protéines différentiellement exprimées d'une condition à l'autre, mais d'essayer de mettre en évidence par recouvrement des données les protéines d'un intérêt majeur.

Cependant, sur un total de 447 protéines identifiées par approche *label free* (dont 50 protéines retrouvées spécifiquement dans une des deux conditions cellulaires) et de 412 protéines identifiées par approche ICPL (dont 290 quantifiées et 81 sur-exprimées dans l'une ou l'autre des conditions cellulaires), seules 4 d'entre elles ont été biochimiquement validées (en qualité de transcrit et/ou de traduit, voire même d'activité enzymatique). Les listes générées par ces deux approches nécessitent un travail conséquent et coûteux afin (i) de confirmer les résultats protéomiques des 127 autres protéines et (ii) d'évaluer l'implication de ces protéines et leur importance dans le phénotype BHE. Cependant, les premières expérimentations biologiques relatives à l'inhibition de la TNAP sont prometteuses. Dans ce domaine, il nous faudra à l'avenir bien évidemment utiliser plus fréquemment les outils de biologie moléculaire comme la RT-PCR quantitative. L'importance fonctionnelle des 4 protéines plus finement étudiées devra également être analysée par transfections cellulaires d'ARN interférents ou d'anticorps spécifiques.

L'approche *label free* a été réalisée sur trois séries expérimentales biologiques alors que pour des raisons de coût, de temps et de matériel, l'approche ICPL a été réalisée sur trois séries expérimentales techniques. Le pourcentage de protéines communes identifiées entre chaque réplicat (biologique ou technique) est au minimum de 68 % ($\pm 12,9$) et atteint 92.6 % ($\pm 1,8$). Ainsi, les pourcentages de protéines nouvellement identifiées entre le premier et le deuxième réplicats biologiques ou techniques sont respectivement de 32,0 % ($\pm 12,9$) (analyse *label free*) et de 31,7 % ($\pm 19,7$) (analyse ICPL). Les pourcentages de protéines nouvellement identifiées entre le troisième et les deux premiers réplicats biologiques ou techniques sont respectivement de 24,0 % ($\pm 13,7$) (analyse *label free*) et de 7,4 % ($\pm 1,8$) (analyse ICPL). Ces pourcentages, ainsi que les déviations standards associées montrent qu'en raison de la variabilité biologique d'échantillon de même origine, il serait idéal de réaliser les analyses sur au minimum 3 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques.

In fine, l'approche chromatographique réalisée dans cette étude s'est révélée efficace. En effet, comparativement aux analyses réalisées par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE = 2D-PAGE classique et 2D-DIGE) (Pottiez *et al.* 2009; Pottiez *et al.* 2010; Pottiez *et al.* 2011; Deracinois *et al.*, *proteomics* en révision), les analyses nano-LC des mêmes échantillons fractionnés en *label free* et ICPL (Deracinois *et al.*, 2012; Pottiez *et al.*, 2010b) a permis d'identifier presque 5 fois plus de protéines pour un recouvrement égal à 100 protéines, montrant ainsi clairement la complémentarité des deux approches (Figure 39 A).

Cette complémentarité est d'autant plus évidente grâce à la comparaison des protéines identifiées spécifiquement en *label free* avec les protéines retrouvées sur-exprimées par approche ICPL ou par les approches 2-DE (Figure 39 B). Sur un total de 166 protéines identifiées spécifiquement ou différemment quantifiées (toutes analyses confondues : *label free*, ICPL et 2-DE), uniquement 19 sont retrouvées dans deux analyses et 1 seule dans les trois (il s'agit de la *prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2*, P4HA2). Cette enzyme (EC 1.14.11.2) catalyse l'hydroxylation des résidus proline des protéines (notamment du collagène) (Kivirikko *et al.*, 1989). Identifiée différemment exprimée par les trois approches, la P4HA2 est ainsi pour nous une protéine d'intérêt dont l'implication au niveau des BCECs reste à déterminer.

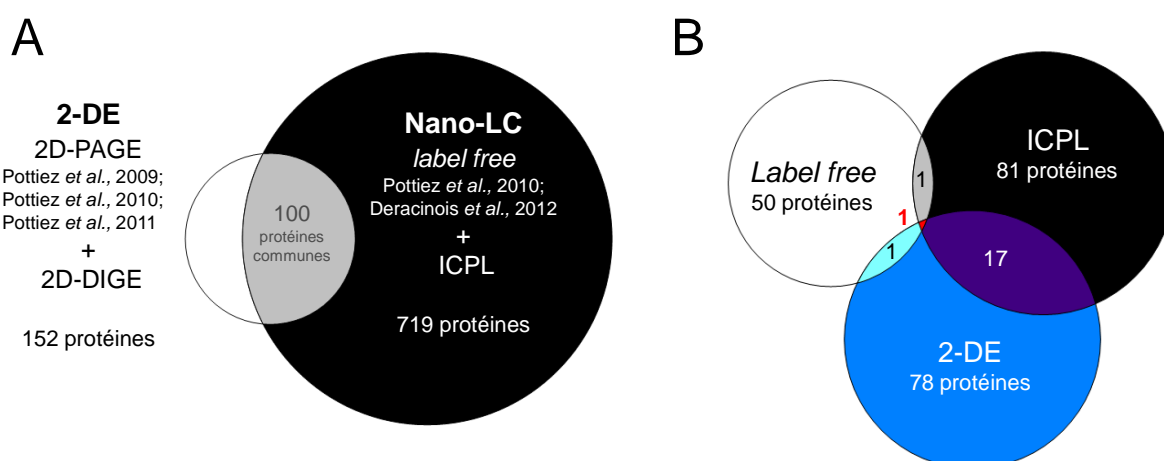


Figure 39 : Comparaison des différentes approches protéomiques utilisées.

(A) Comparaison du nombre de protéines identifiées en 2-DE (2D-PAGE et 2D-DIGE) et en nano-LC (B) Comparaison du nombre de protéines identifiées spécifiquement en *label free* avec le nombre de protéines régulées en ICPL et en 2-DE. 2-DE, électrophorèse bidimensionnelle ; 2D-DIGE, électrophorèse bidimensionnelle différentielle ; 2D-PAGE, électrophorèse bidimensionnelle classique (quantification des protéines par coloration au bleu de Coomassie) ; ICPL, *isotope-coded protein label*.

L'ensemble des protéines identifiées et quantifiées lors de ces analyses chromatographiques et électrophorétiques constitue une base de données relative à la fois au protéome de référence mais aussi au protéome différentiel des BCECs bovines.

2. La BHE, un obstacle à la délivrance des médicaments à visée cérébrale

En raison de sa forte imperméabilité, la BHE constitue un obstacle à la délivrance des médicaments à visée cérébrale, ce qui en fait un sujet d'étude majeur en clinique. Plusieurs voies sont envisagées pour aider les molécules thérapeutiques à atteindre le cerveau : des voies invasives, pharmacologiques ou encore physiologiques (« cheval de Troie ») (Pardridge, 2006). En identifiant les mécanismes moléculaires mis en place après induction des propriétés de BHE, l'objectif de ces travaux était d'élargir les connaissances quant au mode de fonctionnement de cette barrière.

Par notre approche chromatographique *label free*, nous avons mis en évidence 2 protéines sur-exprimées dans les BCECs cultivées en présence de cellules gliales. Ces deux protéines, la TNAP et l'EHD1, sont respectivement une protéine marqueur du phénotype BHE et une protéine impliquée dans le transport vésiculaire. Ainsi, la TNAP et l'EHD1 pourraient faire partie de ces protéines qui constituent un obstacle à l'industrie pharmaceutique par son activité métabolique pour la première ou de recyclage à la membrane des récepteurs ciblés par les médicaments pour la seconde. Par ailleurs, l'inhibition de la TNAP pourrait faciliter le passage des médicaments vers le cerveau par une ouverture temporaire et réversible de la BHE. Ces caractéristiques nécessitent une étude approfondie.

Cependant, le challenge est d'autant plus difficile une fois la molécule active arrivée du côté cérébral. Celle-ci doit alors se dissocier de son vecteur (si besoin) puis atteindre sa cible. De plus, il serait intéressant de permettre le passage des médicaments *via* une cible spécifique de la BHE afin de limiter l'effet toxique potentiel des médicaments sur les autres tissus et d'augmenter la quantité de médicaments qui arrive jusqu'au cerveau.

3. La BHE, implication dans de nombreuses pathologies

La BHE est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que les accidents vasculaires cérébraux, les traumatismes cérébraux, les infections, les inflammations, la sclérose en plaque, la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, l'épilepsie ou encore les tumeurs cérébrales (Abbott *et al.*, 2006; Nag, 2003). Il n'est pas toujours clair de savoir si ces pathologies sont une cause ou une conséquence des désordres survenant au niveau de la BHE comme le plus couramment une perte d'intégrité (augmentation de la perméabilité, altération des mécanismes de transport) de cette dernière conduisant parfois à une entrée massive d'eau (œdème cérébral). Il semble donc essentiel d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de cette dysfonction endothéliale afin d'éviter leur survenue, de les ralentir voir même de les stopper. Ces travaux d'analyse protéomique différentielle appliqués à la comparaison de modèles physiologiques *versus* pathologiques sont des stratégies parfaitement applicables et dotées d'un fort potentiel de réussite qui pourraient nous permettre d'identifier les

protéines potentiellement impliquées dans les mécanismes pathologiques délétères du phénotype BHE, dans le but de créer des thérapies efficaces de restauration ou de protection des fonctions de la BHE. Par exemple, à partir de notre modèle de co-culture cellulaire de BHE, il est possible de mimer, *in vitro*, les conséquences directes d'une ischémie (sous la forme d'une privation d'oxygène et de glucose, OGD) rencontrées lors des accidents vasculaires cérébraux (Brillault *et al.*, 2002; Mysiorek *et al.*, 2009; Plateel *et al.*, 1997). De même, un modèle d'hypercholestérolémie est actuellement en cours de mise au point au laboratoire.

Par notre seconde approche chromatographique ICPL, nous avons mis en évidence deux protéines induites par les cellules gliales au niveau des BCECs : la SODC et la DJ-1. Ces deux protéines sont impliquées dans l'activité antioxydante de la BHE. Il serait intéressant d'étudier, par des méthodes biochimiques conventionnelles, l'expression de ces deux protéines dans ces pathologies et d'étudier l'impact fonctionnel de leur niveau d'expression sur celles-ci.

Le modèle *in vitro* de BHE développé au sein du laboratoire est un outil de choix pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires régissant les propriétés de BHE au sein des BCECs. Dans son ensemble, l'analyse protéomique différentielle de ces cellules nous a permis d'identifier une multitude de protéines induites par la présence des cellules gliales, cellules dont le rôle important au niveau de la BHE n'est plus à prouver. Les résultats issus de ce travail de thèse révèlent une nouvelle fois l'avantage considérable d'une analyse protéomique *shotgun*. La pléthore de protéines identifiées reste maintenant à être étudiée en profondeur. Cependant, l'objectif « ultime » qui consiste à comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires régissant la dynamique de la BHE pour ainsi réussir à « maîtriser » (sans induire d'effet secondaire néfaste) l'entrée et la sortie de n'importe quel composé du sang vers le cerveau ou minimiser voir éviter l'ouverture de la BHE au cours de certains cas pathologiques, est loin d'être atteint.

Bibliographie

- Aasmundstad, T. A., Mørland, J. and Paulsen, R. E.** (1995). Distribution of morphine 6-glucuronide and morphine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats investigated by in vivo microdialysis sampling. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **275**, 435–41.
- Abbott, N. J.** (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* **200**, 629–638.
- Abbott, N. J., Hughes, C. C., Revest, P. A. and Greenwood, J.** (1992). Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier. *J Cell Sci* **103** (Pt 1, 23–37.
- Abbott, N. J., Ronnback, L. and Hansson, E.** (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**, 41–53.
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R. and Begley, D. J.** (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* **37**, 13–25.
- Adams, S. E. and Melnykovych, G.** (1985). Synergistic stimulation of alkaline phosphatase activity in bovine aortic endothelial cells grown in the presence of retinoids and glucocorticoids. *Journal of cellular physiology* **124**, 120–4.
- Addona, T. A., Abbatiello, S. E., Schilling, B., Skates, S. J., Mani, D. R., Bunk, D. M., Spiegelman, C. H., Zimmerman, L. J., Ham, A.-J. L., Keshishian, H., et al.** (2009). Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nature biotechnology* **27**, 633–41.
- Aebersold, R. and Mann, M.** (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207.
- Al Ahmad, A., Gassmann, M. and Ogunshola, O. O.** (2012). Involvement of oxidative stress in hypoxia-induced blood-brain barrier breakdown. *Microvascular research* **84**, 222–5.
- Allt, G. and Lawrenson, J. G.** (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* **169**, 1–11.
- Anderson, N. L. and Anderson, N. G.** (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**, 1853–61.
- Ando, J. and Yamamoto, K.** (2009). Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society* **73**, 1983–92.
- Apweiler, R., Bairoch, A. and Wu, C. H.** (2004). Protein sequence databases. *Current opinion in chemical biology* **8**, 76–80.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., et al.** (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* **468**, 557–61.
- Aschner, M.** (1998). Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicology letters* **102-103**, 283–7.
- Awasthi, S., Hallene, K. L., Fazio, V., Singhal, S. S., Cucullo, L., Awasthi, Y. C., Dini, G. and Janigro, D.** (2005). RLIP76, a non-ABC transporter, and drug resistance in epilepsy. *BMC neuroscience* **6**, 61.
- Balabanov, R. and Dore-Duffy, P.** (1998). Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *Journal of neuroscience research* **53**, 637–44.
- Balasubramaniam, S., Bowling, F., Carpenter, K., Earl, J., Chaitow, J., Pitt, J., Mornet, E., Sillence, D. and Ellaway, C.** (2010). Perinatal hypophosphatasia presenting as neonatal epileptic

- encephalopathy with abnormal neurotransmitter metabolism secondary to reduced co-factor pyridoxal-5'-phosphate availability. *Journal of inherited metabolic disease*.
- Balayssac, D., Authier, N., Cayre, A. and Coudore, F.** (2005). Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions? *Toxicol Lett* **156**, 319–329.
- Balda, M. S. and Matter, K.** (2009). Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 761–7.
- Balin, B. J., Broadwell, R. D. and Salcman, M.** (1987). Tubular profiles do not form transendothelial channels through the blood-brain barrier. *Journal of neurocytology* **16**, 721–35.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. and Kuster, B.** (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry* **389**, 1017–31.
- Barrios-Rodiles, M., Brown, K. R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R. S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I. W., et al.** (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)* **307**, 1621–5.
- Bates, J. M., Akerlund, J., Mittge, E. and Guillemin, K.** (2007). Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell host & microbe* **2**, 371–82.
- Bauer, H. C. and Bauer, H.** (2000). Neural induction of the blood-brain barrier: still an enigma. *Cellular and molecular neurobiology* **20**, 13–28.
- Bazzoni, G. and Dejana, E.** (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* **84**, 869–901.
- Beck, D. W., Roberts, R. L. and Olson, J. J.** (1986). Glial cells influence membrane-associated enzyme activity at the blood-brain barrier. *Brain research* **381**, 131–7.
- Begley, D. J.** (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & therapeutics* **104**, 29–45.
- Begley, D. J. and Brightman, M. W.** (2003). Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res* **61**, 39–78.
- Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R. and Zlokovic, B. V.** (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* **68**, 409–27.
- Bendayan, R., Ronaldson, P. T., Gingras, D. and Bendayan, M.** (2006). In situ localization of P-glycoprotein (ABCB1) in human and rat brain. *J Histochem Cytochem* **54**, 1159–1167.
- Bentala, H., Verweij, W. R., Huizinga-Van der Vlag, A., van Loenen-Weemaes, A. M., Meijer, D. K. F. and Poelstra, K.** (2002). Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. *Shock (Augusta, Ga.)* **18**, 561–6.
- Bentzel, C. J., Hainau, B., Edelman, A., Anagnostopoulos, T. and Benedetti, E. L.** (1976). Effect of plant cytokinins on microfilaments and tight junction permeability. *Nature* **264**, 666–8.
- Berezowski, V., Landry, C., Dehouck, M. P., Cecchelli, R. and Fenart, L.** (2004a). Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res* **1018**, 1–9.
- Berezowski, V., Miecz, D., Marszalek, M., Broer, A., Broer, S., Cecchelli, R., Nalecz, K. A., Marszałek, M., Bröer, A., Bröer, S., et al.** (2004b). Involvement of OCTN2 and B0,+ in the transport of carnitine through an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Neurochem* **91**, 860–872.

- Berezowski, V., Fukuda, A. M., Cecchelli, R. and Badaut, J.** (2012). Endothelial Cells and Astrocytes: A Concerto en Duo in Ischemic Pathophysiology. *International journal of cell biology* **2012**, 176287.
- Bernas, M. J., Cardoso, F. L., Daley, S. K., Weinand, M. E., Campos, A. R., Ferreira, A. J. G., Hoying, J. B., Witte, M. H., Brites, D., Persidsky, Y., et al.** (2010). Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier. *Nature protocols* **5**, 1265–72.
- Betz, A. L., Firth, J. A. and Goldstein, G. W.** (1980). Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res* **192**, 17–28.
- Beuckmann, C., Hellwig, S. and Galla, H. J.** (1995). Induction of the blood/brain-barrier-associated enzyme alkaline phosphatase in endothelial cells from cerebral capillaries is mediated via cAMP. *European journal of biochemistry / FEBS* **229**, 641–4.
- Beynon, R. J., Doherty, M. K., Pratt, J. M. and Gaskell, S. J.** (2005). Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nature Methods* **2**, 587–589.
- Bickel, U.** (2005). How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2**, 15–26.
- Biegel, D., Spencer, D. D. and Pachter, J. S.** (1995). Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties in vitro. *Brain research* **692**, 183–9.
- Black, K. L., Baba, T. and Pardridge, W. M.** (1994). Enzymatic barrier protects brain capillaries from leukotriene C4. *J Neurosurg* **81**, 745–751.
- Blueggel, M., Chamrad, D. and Meyer, H. E.** (2004). Bioinformatics in proteomics. *Current pharmaceutical biotechnology* **5**, 79–88.
- Bodzon-Kulakowska, A., Bierzynska-Krzysik, A., Dylag, T., Drabik, A., Suder, P., Noga, M., Jarzebinska, J. and Silberring, J.** (2007). Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **849**, 1–31.
- Bondarenko, P. V., Chelius, D. and Shaler, T. A.** (2002). Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry* **74**, 4741–9.
- Bonkowski, D., Katyshev, V., Balabanov, R. D., Borisov, A. and Dore-Duffy, P.** (2011). The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids and barriers of the CNS* **8**, 8.
- Bottari, P., Aebersold, R., Turecek, F. and Gelb, M. H.** (2004). Design and synthesis of visible isotope-coded affinity tags for the absolute quantification of specific proteins in complex mixtures. *Bioconjugate chemistry* **15**, 380–8.
- Boveri, M., Berezowski, V., Price, A., Slupek, S., Lenfant, A.-M. M., Benaud, C., Hartung, T., Cecchelli, R., Prieto, P. and Dehouck, M.-P. P.** (2005). Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: comparison between primary glial cells and C6 cell line. *Glia* **51**, 187–98.
- Bowman, P. D., Betz, A. L., Ar, D., Wolinsky, J. S., Penney, J. B., Shivers, R. R. and Goldstein, G. W.** (1981). Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In vitro* **17**, 353–62.
- Bowman, P. D., Ennis, S. R., Rarey, K. E., Betz, A. L. and Goldstein, G. W.** (1983). Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Annals of neurology* **14**, 396–402.

- Braisted, J. C., Kuntumalla, S., Vogel, C., Marcotte, E. M., Rodrigues, A. R., Wang, R., Huang, S.-T., Ferlanti, E. S., Saeed, A. I., Fleischmann, R. D., et al.** (2008). The APEX Quantitative Proteomics Tool: generating protein quantitation estimates from LC-MS/MS proteomics results. *BMC bioinformatics* **9**, 529.
- Brambilla, D., Le Droumaguet, B., Nicolas, J., Hashemi, S. H., Wu, L.-P., Moghimi, S. M., Couvreur, P. and Andrieux, K.** (2011). Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* **7**, 521–40.
- Braun, R. J., Kinkl, N., Beer, M. and Ueffing, M.** (2007). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Analytical and bioanalytical chemistry* **389**, 1033–45.
- Brendel, K., Meezan, E. and Carlson, E. C.** (1974). Isolated brain microvessels: a purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. *Science (New York, N.Y.)* **185**, 953–5.
- Brillault, J., Berezowski, V., Cecchelli, R. and Dehouck, M. P.** (2002). Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J Neurochem* **83**, 807–817.
- Broadwell, R. D., Balin, B. J. and Salzman, M.** (1988). Transcytotic pathway for blood-borne protein through the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 632–6.
- Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Court, M., Vandenesch, F. and Garin, J.** (2007). Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **6**, 2139–49.
- Brun-Heath, I., Ermonval, M., Chabrol, E., Xiao, J., Palkovits, M., Lyck, R., Miller, F., Couraud, P.-O., Mornet, E. and Fonta, C.** (2011). Differential expression of the bone and the liver tissue non-specific alkaline phosphatase isoforms in brain tissues. *Cell and tissue research* **343**, 521–36.
- Calabria, A. R. and Shusta, E. V.** (2006). Blood-brain barrier genomics and proteomics: elucidating phenotype, identifying disease targets and enabling brain drug delivery. *Drug Discov Today* **11**, 792–799.
- Calhau, C., Martel, F., Pinheiro-Silva, S., Pinheiro, H., Soares-da-Silva, P., Hipólito-Reis, C. and Azevedo, I.** (2002a). Modulation of insulin transport in rat brain microvessel endothelial cells by an ecto-phosphatase activity. *Journal of cellular biochemistry* **84**, 389–400.
- Calhau, C., Martel, F., Soares-da-Silva, P., Hipólito-Reis, C. and Azevedo, I.** (2002b). Regulation of [(3)H]MPP(+) transport by phosphorylation/dephosphorylation pathways in RBE4 cells: role of ecto-alkaline phosphatase. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **365**, 349–56.
- Candela, P., Gosselet, F., Miller, F., Buee-Scherrer, V., Torpier, G., Cecchelli, R. and Fenart, L.** (2008). Physiological pathway for low-density lipoproteins across the blood-brain barrier: transcytosis through brain capillary endothelial cells in vitro. *Endothelium* **15**, 254–264.
- Candela, P., Gosselet, F., Saint-Pol, J., Sevin, E., Boucau, M. C., Boulanger, E., Cecchelli, R. and Fenart, L.** (2010). Apical-to-basolateral transport of amyloid-beta peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *J Alzheimers Dis* **22**, 849–859.
- Catalán, R. E., Martínez, A. M., Aragonés, M. D., Martínez, A. and Díaz, G.** (1996). Endothelin stimulates phosphoinositide hydrolysis and PAF synthesis in brain microvessels. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **16**, 1325–34.

- Cayrol, R., Haqqani, A. S., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A. and Prat, A.** (2011). Isolation of human brain endothelial cells and characterization of lipid raft-associated proteins by mass spectroscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **686**, 275–95.
- Cecchelli, R., Dehouck, B., Descamps, L., Fenart, L., Buee-Scherrer, V. V., Duhem, C., Lundquist, S., Rentfel, M., Torpier, G. and Dehouck, M. P.** (1999). In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **36**, 165–178.
- Cecchelli, R., Coisne, C., Dehouck, L., Miller, F., Dehouck, M.-P., Buée-Scherrer, V. and Dehouck, B.** (2006). *Modeling the Blood-Brain Barrier*. (ed. Dermietzel, R., Spray, D. C., and Nedergaard, M.) Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M.-P. P. and Fenart, L.** (2007). Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 650–661.
- Cestelli, A., Catania, C., D'Agostino, S., Di Liegro, I., Licata, L., Schiera, G., Pitarresi, G. L., Savettieri, G., De Caro, V., Giandalia, G., et al.** (2001). Functional feature of a novel model of blood brain barrier: studies on permeation of test compounds. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* **76**, 139–47.
- Chakraborty, A. and Regnier, F. E.** (2002). Global internal standard technology for comparative proteomics. *Journal of chromatography. A* **949**, 173–84.
- Chen, J. J. and Ly, A.-V.** (2006). Rasagiline: A second-generation monoamine oxidase type-B inhibitor for the treatment of Parkinson's disease. *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* **63**, 915–28.
- Chen, J., Li, L. and Chin, L.-S.** (2010). Parkinson disease protein DJ-1 converts from a zymogen to a protease by carboxyl-terminal cleavage. *Human molecular genetics* **19**, 2395–408.
- Clements, C. M., McNally, R. S., Conti, B. J., Mak, T. W. and Ting, J. P.-Y.** (2006). DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 15091–6.
- Coisne, C., Dehouck, L., Faveeuw, C., Delplace, Y., Miller, F., Landry, C., Morissette, C., Fenart, L., Cecchelli, R., Tremblay, P., et al.** (2005). Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* **85**, 734–746.
- Colomé, N., Collado, J., Bech-Serra, J. J., Liiv, I., Antón, L. C., Peterson, P., Canals, F., Jaraquemada, D. and Alvarez, I.** (2010). Increased apoptosis after autoimmune regulator expression in epithelial cells revealed by a combined quantitative proteomics approach. *Journal of proteome research* **9**, 2600–9.
- Com, E., Clavreul, A., Lagarrigue, M., Michalak, S., Menei, P. and Pineau, C.** (2012). Quantitative proteomic Isotope-Coded Protein Label (ICPL) analysis reveals alteration of several functional processes in the glioblastoma. *Journal of proteomics* **75**, 3898–913.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R. and Bertino, J. R.** (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 695–698.
- Cucullo, L., Marchi, N., Hossain, M. and Janigro, D.** (2011). A dynamic in vitro BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **31**, 767–77.

- Culot, M., Lundquist, S., Vanuxeem, D., Nion, S., Landry, C., Delplace, Y., Dehouck, M. P., Berezowski, V., Fenart, L. and Cecchelli, R.** (2008). An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro* **22**, 799–811.
- Culot, M., Mysiorek, C., Renftel, M., Roussel, B. D., Hommet, Y., Vivien, D., Cecchelli, R., Fenart, L., Berezowski, V., Dehouck, M. P., et al.** (2009). Cerebrovascular protection as a possible mechanism for the protective effects of NXY-059 in preclinical models: an in vitro study. *Brain Res.*
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. and Milzani, A.** (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry* **52**, 601–23.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A. and Barres, B. A.** (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* **468**, 562–6.
- De Bock, M., Culot, M., Wang, N., da Costa, A., Decrock, E., Bol, M., Bultynck, G., Cecchelli, R. and Leybaert, L.** (2012). Low extracellular Ca(2+) conditions induce an increase in brain endothelial permeability that involves intercellular Ca(2+) waves. *Brain research.*
- de Boer, A. G., van der Sandt, I. C. J. and Gaillard, P. J.** (2003). The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annual review of pharmacology and toxicology* **43**, 629–56.
- De Gregori, S., De Gregori, M., Ranzani, G. N., Allegri, M., Minella, C. and Regazzi, M.** (2012). Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metabolic brain disease* **27**, 1–5.
- de Vries, H. E., Witte, M., Hondius, D., Rozemuller, A. J. M., Drukarch, B., Hoozemans, J. and van Horssen, J.** (2008). Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free radical biology & medicine* **45**, 1375–83.
- DeBault, L. E.** (1981). gamma-Glutamyltranspeptidase induction mediated by glial foot process-to endothelium contact in co-culture. *Brain research* **220**, 432–5.
- DeBault, L. E. and Cancilla, P. A.** (1980). gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science (New York, N. Y.)* **207**, 653–5.
- Decleves, X., Jacob, A., Yousif, S., Shawahna, R., Potin, S. and Scherrmann, J.-M.** (2011). Interplay of drug metabolizing CYP450 enzymes and ABC transporters in the blood-brain barrier. *Current drug metabolism* **12**, 732–41.
- Deeb, S. J., D'Souza, R. C. J., Cox, J., Schmidt-Suppran, M. and Mann, M.** (2012). Super-SILAC Allows Classification of Diffuse Large B-cell Lymphoma Subtypes by Their Protein Expression Profiles. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **11**, 77–89.
- Dehouck, M. P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J. C. and Cecchelli, R.** (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* **54**, 1798–1801.
- Dehouck, M. P., Jolliet-Riant, P., Bree, F., Fruchart, J. C., Cecchelli, R. and Tillement, J. P.** (1992). Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J Neurochem* **58**, 1790–1797.
- Dehouck, B., Dehouck, M. P., Fruchart, J. C. and Cecchelli, R.** (1994). Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol* **126**, 465–473.
- Dehouck, M. P., Vigne, P., Torpier, G., Breittmayer, J. P., Cecchelli, R. and Frelin, C.** (1997a). Endothelin-1 as a mediator of endothelial cell-pericyte interactions in bovine brain capillaries. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 464–469.

- Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M. P., Pierce, A., Torpier, G. and Cecchelli, R.** (1997b). A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* **138**, 877–889.
- Dejana, E. and Del Maschio, A.** (1995). Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium. *Thromb Haemost* **74**, 309–312.
- Dejana, E. and Giampietro, C.** (2012). Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. *Current opinion in hematology* **19**, 218–23.
- Deli, M. a., Abraham, C. S., Kataoka, Y., Niwa, M. and Ábrahám, C. S.** (2005). Permeability Studies on In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology* **25**, 59–127.
- Delorme, P., Grignon, G. and Gayet, J.** (1968). [Ultrastructure of the capillaries in the telencephalon of the chicken during embryogenesis and postnatal growth]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **87**, 592–602.
- Deracinois, B., Duban-Deweir, S., Pottiez, G., Cecchelli, R., Karamanos, Y. and Flahaut, C.** (2012). TNAP and EHD1 Are Over-Expressed in Bovine Brain Capillary Endothelial Cells after the Re-Induction of Blood-Brain Barrier Properties. *PLoS ONE* **7**, e48428.
- Desagher, S., Glowinski, J. and Premont, J.** (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 2553–62.
- Descamps, L., Dehouck, M. P., Torpier, G. and Cecchelli, R.** (1996). Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am J Physiol* **270**, H1149–58.
- Descamps, L., Cecchelli, R. and Torpier, G.** (1997). Effects of tumor necrosis factor on receptor-mediated endocytosis and barrier functions of bovine brain capillary endothelial cell monolayers. *Journal of neuroimmunology* **74**, 173–84.
- Descamps, L., Coisne, C., Dehouck, B., Cecchelli, R. and Torpier, G.** (2003). Protective effect of glial cells against lipopolysaccharide-mediated blood-brain barrier injury. *Glia* **42**, 46–58.
- Desiderio, C., Rossetti, D. V., Iavarone, F., Messana, I. and Castagnola, M.** (2010). Capillary electrophoresis--mass spectrometry: recent trends in clinical proteomics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **53**, 1161–9.
- Dewey, C. F., Bussolari, S. R., Gimbrone, M. A. and Davies, P. F.** (1981). The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *Journal of biomechanical engineering* **103**, 177–85.
- Di, L., Kerns, E. H., Fan, K., McConnell, O. J. and Carter, G. T.** (2003). High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *European journal of medicinal chemistry* **38**, 223–32.
- Di Palma, S., Hennrich, M. L., Heck, A. J. R. and Mohammed, S.** (2012). Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. *Journal of proteomics* **75**, 3791–3813.
- Di Salvo, M. L., Contestabile, R. and Safo, M. K.** (2011). Vitamin B(6) salvage enzymes: mechanism, structure and regulation. *Biochimica et biophysica acta* **1814**, 1597–608.
- Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A., Nakagawa, S., Egawa, T., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., Niwa, M. and Kataoka, Y.** (2005). Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain research* **1038**, 208–15.

- Dorovini-Zis, K., Prameya, R. and Bowman, P. D.** (1991). Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **64**, 425–36.
- Duffy, K. R. and Pardridge, W. M.** (1987). Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. *Brain Res* **420**, 32–38.
- Duport, S., Robert, F., Muller, D., Grau, G., Parisi, L. and Stoppini, L.** (1998). An in vitro blood-brain barrier model: cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 1840–5.
- Díaz-Hernández, M., Gómez-Ramos, A., Rubio, A., Gómez-Villafuertes, R., Naranjo, J. R., Miras-Portugal, M. T. and Avila, J.** (2010). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *The Journal of biological chemistry* **285**, 32539–48.
- Díez-Zaera, M., Díaz-Hernández, J. I., Hernández-Álvarez, E., Zimmermann, H., Díaz-Hernández, M. and Miras-Portugal, M. T.** (2011). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Molecular biology of the cell* **22**, 1014–24.
- Fazekas de St Groth, S., Webster, R. G. and Datyner, A.** (1963). Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et biophysica acta* **71**, 377–91.
- Fenart, L., Buee-Scherrer, V., Descamps, L., Duhem, C., Poullain, M. G., Cecchelli, R. and Dehouck, M. P.** (1998). Inhibition of P-glycoprotein: rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain by an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res* **15**, 993–1000.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M.** (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)* **246**, 64–71.
- Fenselau, C. and Yao, X.** (2009). 18O₂-labeling in quantitative proteomic strategies: a status report. *Journal of proteome research* **8**, 2140–3.
- Fichtman, B., Ravid, L., Rapaport, D. and Horowitz, M.** (2008). EHDS are serine phosphoproteins: EHD1 phosphorylation is enhanced by serum stimulation. *Cellular & molecular biology letters* **13**, 632–48.
- Fishman, J. B., Rubin, J. B., Handrahan, J. V., Connor, J. R. and Fine, R. E.** (1987). Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* **18**, 299–304.
- Fletcher, N. F., Brayden, D. J., Brankin, B., Worrall, S. and Callanan, J. J.** (2006). Growth and characterisation of a cell culture model of the feline blood-brain barrier. *Veterinary immunology and immunopathology* **109**, 233–44.
- Frank, P. G., Woodman, S. E., Park, D. S. and Lisanti, M. P.** (2003). Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1161–1168.
- Franke, H., Galla, H. and Beuckmann, C. T.** (2000). Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. *Brain research. Brain research protocols* **5**, 248–56.
- Fukai, T. and Ushio-Fukai, M.** (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling* **15**, 1583–606.
- Gabathuler, R.** (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of disease* **37**, 48–57.

- Gasche, Y., Soccal, P. M., Kanemitsu, M. and Copin, J. C.** (2006). Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci* **11**, 1289–1301.
- Gee, J. R. and Keller, J. N.** (2005). Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**, 1145–50.
- Gehanne, S., Cecconi, D., Carboni, L., Righetti, P. G., Domenici, E. and Hamdan, M.** (2002). Quantitative analysis of two-dimensional gel-separated proteins using isotopically marked alkylating agents and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* **16**, 1692–8.
- Geiger, T., Cox, J., Ostasiewicz, P., Wisniewski, J. R. and Mann, M.** (2010). Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nature methods* **7**, 383–5.
- Gerber, S. a, Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W. and Gygi, S. P.** (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6940–5.
- Gherzi-Egea, J. F., Leininger-Muller, B., Cecchelli, R. and Fenstermacher, J. D.** (1995). Blood-brain interfaces: relevance to cerebral drug metabolism. *Toxicol Lett* **82-83**, 645–653.
- Girouard, H. and Iadecola, C.** (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* **100**, 328–335.
- Gokce, E., Franck, W. L., Oh, Y., Dean, R. A. and Muddiman, D. C.** (2012). In-depth Analysis of the Magnaporthe oryzae Conidial Proteome. *Journal of proteome research*.
- Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R. and Chamorro, D.** (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 729–756.
- Goodlett, D. R., Keller, A., Watts, J. D., Newitt, R., Yi, E. C., Purvine, S., Eng, J. K., von Haller, P., Aebersold, R. and Kolker, E.** (2001). Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* **15**, 1214–21.
- Goshe, M. B., Conrads, T. P., Panisko, E. a, Angell, N. H., Veenstra, T. D. and Smith, R. D.** (2001). Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses. *Analytical chemistry* **73**, 2578–86.
- Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R. and Fenart, L.** (2009). Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Res* **1249**, 34–42.
- Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S. and Louvard, D.** (1996). The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10779–10784.
- Grieb, P., Forster, R. E., Strome, D., Goodwin, C. W. and Pape, P. C.** (1985). O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator-dilution technique. *J Appl Physiol* **58**, 1929–1941.
- Gumbleton, M. and Audus, K. L.** (2001). Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Journal of pharmaceutical sciences* **90**, 1681–98.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H. and Aebersold, R.** (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature biotechnology* **17**, 994–9.

- Görg, A., Weiss, W. and Dunn, M. J.** (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665–85.
- Haaf, E. and Schlosser, A.** (2012). Peptide and protein quantitation by acid-catalyzed ¹⁸O-labeling of carboxyl groups. *Analytical chemistry* **84**, 304–11.
- Haberman, A.** (2008). Blood-Brain Barrier: Bridging options for drug discovery and development. *Insight Pharma Reports*.
- Hagenbuch, B. and Meier, P. J.** (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* **1609**, 1–18.
- Hansen, A. J., Lund-Andersen, H. and Crone, C.** (1977). K⁺-permeability of the blood-brain barrier, investigated by aid of a K⁺-sensitive microelectrode. *Acta Physiol Scand* **101**, 438–445.
- Haseloff, R. F., Blasig, I. E., Bauer, H. C. and Bauer, H.** (2005). In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* **25**, 25–39.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J. and Stevenson, B. R.** (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* **141**, 199–208.
- Hawkins, B. T. and Davis, T. P.** (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **57**, 173–185.
- Hawkins, R. A., O’Kane, R. L., Simpson, I. A. and Vina, J. R.** (2006). Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr* **136**, 218S–26S.
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J. and Yamamoto, H.** (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* **19**, 13–26.
- Hayashi, K., Nakao, S., Nakaoke, R., Nakagawa, S., Kitagawa, N. and Niwa, M.** (2004). Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept* **123**, 77–83.
- Hellstrom, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H. and Betsholtz, C.** (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* **153**, 543–553.
- Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C. and Watanabe, C.** (1993). Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5011–5.
- Herve, F., Ghinea, N. and Scherrmann, J. M.** (2008). CNS delivery via adsorptive transcytosis. *Aaps J* **10**, 455–472.
- Hori, S., Ohtsuki, S., Hosoya, K., Nakashima, E. and Terasaki, T.** (2004). A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem* **89**, 503–513.
- Hsu, J.-L., Huang, S.-Y. and Chen, S.-H.** (2006). Dimethyl multiplexed labeling combined with microcolumn separation and MS analysis for time course study in proteomics. *Electrophoresis* **27**, 3652–60.
- Huber, J. D., Egleton, R. D. and Davis, T. P.** (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* **24**, 719–725.

- Hörth, P., Miller, C. A., Preckel, T. and Wenz, C.** (2006). Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **5**, 1968–74.
- Ikeda, M., Ishida, O., Hinoi, T., Kishida, S. and Kikuchi, A.** (1998). Identification and characterization of a novel protein interacting with Ral-binding protein 1, a putative effector protein of Ral. *The Journal of biological chemistry* **273**, 814–21.
- Inoue, N., Ramasamy, S., Fukai, T., Nerem, R. M. and Harrison, D. G.** (1996). Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circulation research* **79**, 32–7.
- Ishihama, Y., Sato, T., Tabata, T., Miyamoto, N., Sagane, K., Nagasu, T. and Oda, Y.** (2005a). Quantitative mouse brain proteomics using culture-derived isotope tags as internal standards. *Nature biotechnology* **23**, 617–21.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J. and Mann, M.** (2005b). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **4**, 1265–72.
- Itoh, M. and Bissell, M. J.** (2003). The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**, 449–462.
- James, P., Quadroni, M., Carafoli, E. and Gonnet, G.** (1993). Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochemical and biophysical research communications* **195**, 58–64.
- Jefferies, W. A., Brandon, M. R., Hunt, S. V., Williams, A. F., Gatter, K. C. and Mason, D. Y.** (1984). Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* **312**, 162–3.
- Jones, A. R. and Shusta, E. V.** (2007). Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediated. *Pharmaceutical research* **24**, 1759–71.
- Jović, M., Kieken, F., Naslavsky, N., Sorgen, P. L. and Caplan, S.** (2009). Eps15 homology domain 1-associated tubules contain phosphatidylinositol-4-phosphate and phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate and are required for efficient recycling. *Molecular biology of the cell* **20**, 2731–43.
- Joó, F.** (1985). The blood-brain barrier in vitro: Ten years of research on microvessels isolated from the brain. *Neurochemistry international* **7**, 1–25.
- Joó, F. and Karnushina, I.** (1973). A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. *Cytobios* **8**, 41–8.
- Kansy, M., Senner, F. and Gubernator, K.** (1998). Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of medicinal chemistry* **41**, 1007–10.
- Karas, M. and Hillenkamp, F.** (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry* **60**, 2299–301.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. and Hillenkamp, F.** (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **78**, 53–68.
- Kassner, A. and Thornhill, R.** (2011). Measuring the integrity of the human blood-brain barrier using magnetic resonance imaging. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **686**, 229–45.
- Kats, S.** (2011). Alkaline phosphatase : an old enzyme newly discovered : implications in cardiac surgery. 133.

- Kellermann, J.** (2008). ICPL--isotope-coded protein label. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **424**, 113–23.
- Kieken, F., Jović, M., Naslavsky, N., Caplan, S. and Sorgen, P. L.** (2007). EH domain of EHD1. *Journal of biomolecular NMR* **39**, 323–9.
- Kivirikko, K. I., Myllylä, R. and Pihlajaniemi, T.** (1989). Protein hydroxylation: prolyl 4-hydroxylase, an enzyme with four cosubstrates and a multifunctional subunit. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **3**, 1609–17.
- Kniesel, U. and Wolburg, H.** (2000). Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* **20**, 57–76.
- Koehler, R. C., Roman, R. J. and Harder, D. R.** (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci* **32**, 160–169.
- Kroksveen, A. C., Aasebø, E., Vethe, H., Van Pesch, V., Franciotta, D., Teunissen, C., Ulvik, R. J., Vedeler, C., Myhr, K.-M., Barsnes, H., et al.** (2012). Discovery and initial verification of differentially abundant proteins between multiple sclerosis patients and controls using iTRAQ and SID-SRM. *Journal of proteomics* **S1874-3919**, 00693–8.
- Kurono, S., Kurono, T., Komori, N., Niwayama, S. and Matsumoto, H.** (2006). Quantitative proteome analysis using D-labeled N-ethylmaleimide and ¹³C-labeled iodoacetanilide by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Bioorganic & medicinal chemistry* **14**, 8197–209.
- Kusuhara, H. and Sugiyama, Y.** (2005). Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family. *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2**, 73–85.
- Kügler, S., Böcker, K., Heusipp, G., Greune, L., Kim, K. S. and Schmidt, M. A.** (2007). Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model. *Cellular microbiology* **9**, 619–32.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lai, F. M., Udenfriend, S. and Spector, S.** (1975). Presence of norepinephrine and related enzymes in isolated brain microvessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4622–4625.
- Langer, D., Hammer, K., Koszalka, P., Schrader, J., Robson, S. and Zimmermann, H.** (2008). Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell and tissue research* **334**, 199–217.
- Lasbennes, F. and Gayet, J.** (1984). Capacity for energy metabolism in microvessels isolated from rat brain. *Neurochem Res* **9**, 1–10.
- Leino, R. L., Gerhart, D. Z. and Drewes, L. R.** (1999). Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats: a quantitative electron microscopic immunogold study. *Brain research. Developmental brain research* **113**, 47–54.
- Leroy, B., Rosier, C., Erculisse, V., Leys, N., Mergeay, M. and Wattiez, R.** (2010). Differential proteomic analysis using isotope-coded protein-labeling strategies: comparison, improvements and application to simulated microgravity effect on *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Proteomics* **10**, 2281–91.
- Li, S., Couet, J. and Lisanti, M. P.** (1996). Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* **271**, 29182–90.

- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C. J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., et al. (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology* **183**, 409–17.
- Liebner, S., Czupalla, C. J. and Wolburg, H. (2011). Current concepts of blood-brain barrier development. *The International journal of developmental biology* **55**, 467–76.
- Lippmann, E. S., Azarin, S. M., Kay, J. E., Nessler, R. A., Wilson, H. K., Al-Ahmad, A., Palecek, S. P. and Shusta, E. V. (2012). Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* **30**(8), 783–91.
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y. H., Cook, R. F. and Sargiacomo, M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* **126**, 111–126.
- Liu, H., Sadygov, R. G. and Yates, J. R. (2004). A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytical chemistry* **76**, 4193–201.
- Liu, L. B., Xue, Y. X., Liu, Y. H. and Wang, Y. B. (2008). Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* **86**, 1153–1168.
- Lottspeich, F. and Kellermann, J. (2010). ICPL Labeling Strategies for Proteome Research. *Gel-Free Proteomics, Methods in Molecular Biology* 55–64.
- Lu, L., Yang, P. Y., Rui, Yc., Kang, H., Zhang, J., Zhang, J. P. and Feng, W. H. (2007a). Comparative proteome analysis of rat brain and coronary microvascular endothelial cells. *Physiol Res* **56**, 159–168.
- Lu, P., Vogel, C., Wang, R., Yao, X. and Marcotte, E. M. (2007b). Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nature biotechnology* **25**, 117–24.
- Lundquist, S., Renftel, M., Brillault, J., Fenart, L., Cecchelli, R. and Dehouck, M. P. (2002). Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo: a comparison between two in vitro cell models. *Pharm Res* **19**, 976–981.
- Mabry, C. C., Bautista, A., Kirk, R. F., Dubilier, L. D., Braunstein, H. and Koepke, J. A. (1970). Familial hyperphosphatase with mental retardation, seizures, and neurologic deficits. *The Journal of pediatrics* **77**, 74–85.
- MacLean, A. G., Orandle, M. S., MacKey, J., Williams, K. C., Alvarez, X. and Lackner, A. A. (2002). Characterization of an in vitro rhesus macaque blood-brain barrier. *Journal of neuroimmunology* **131**, 98–103.
- Maccarrone, G., Turck, C. W. and Martins-de-Souza, D. (2010). Shotgun mass spectrometry workflow combining IEF and LC-MALDI-TOF/TOF. *The protein journal* **29**, 99–102.
- Maier, C. M. and Chan, P. H. (2002). Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **8**, 323–34.
- Mann, M., Højrup, P. and Roepstorff, P. (1993). Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biological mass spectrometry* **22**, 338–45.
- Mann, G. E., Yudilevich, D. L. and Sobrevia, L. (2003). Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiological reviews* **83**, 183–252.

- Marroni, M., Kight, K. M., Hossain, M., Cucullo, L., Desai, S. Y. and Janigro, D.** (2003). Dynamic in vitro model of the blood-brain barrier. Gene profiling using cDNA microarray analysis. *Methods in molecular medicine* **89**, 419–34.
- Mason, B. P.** (2009). High-Throughput Measurement of Physicochemical Properties. Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability. *Wiley-VCH, Weinheim*.
- Maxwell, K., Berliner, J. A. and Cancilla, P. A.** (1987). Induction of gamma-glutamyl transpeptidase in cultured cerebral endothelial cells by a product released by astrocytes. *Brain research* **410**, 309–14.
- Mayer, S., Maickel, R. P. and Brodie, B. B.** (1959). Kinetics of penetration of drugs and other foreign compounds into cerebrospinal fluid and brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**, 205–211.
- Mazoyer, B.** (2002). L' imagerie cérébrale : IRM et TEP. *Pour la sciences n°302*.
- Mcclatchy, D. B., Dong, M., Wu, C. C., Venable, J. D. and John, R.** (2010). NIH Public Access. *Proteome* **6**, 2005–2010.
- Mehdipour, A. R. and Hamidi, M.** (2009). Brain drug targeting: a computational approach for overcoming blood-brain barrier. *Drug discovery today* **14**, 1030–6.
- Mehta, D. and Malik, A. B.** (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews* **86**, 279–367.
- Mensch, J., Oyarzabal, J., Mackie, C. and Augustijns, P.** (2009). In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *Journal of pharmaceutical sciences* **98**, 4429–68.
- Meresse, S., Delbart, C., Fruchart, J. C. and Cecchelli, R.** (1989). Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem* **53**, 340–345.
- Merril, C. R., Switzer, R. C. and Keurent, M. L. V. A. N.** (1979). Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain *Biochemistry* : **76**, 4335–4339.
- Mertsch K. and Maas J.** (2002). Blood-Brain Barrier Penetration and Drug Development from an Industrial Point of View. *Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents* **2**, 15.
- Meunier, M. T. and Bouchaud, C.** (1978). [Histochemical contribution to the study of the rat blood-brain barrier (author's transl)]. *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie expérimentale* **67**, 81–98.
- Meyer, J., Mischeck, U., Veyhl, M., Henzel, K. and Galla, H. J.** (1990). Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res* **514**, 305–309.
- Mi, H. and Thomas, P.** (2009). PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **563**, 123–40.
- Minden, J. S., Dowd, S. R., Meyer, H. E. and Stühler, K.** (2009). Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis* **30 Suppl 1**, S156–61.
- Mintz, L., Galperin, E., Pasmanik-Chor, M., Tulzinsky, S., Bromberg, Y., Kozak, C. A., Joyner, A., Fein, A. and Horowitz, M.** (1999). EHD1--an EH-domain-containing protein with a specific expression pattern. *Genomics* **59**, 66–76.
- Mirgorodskaya, O. a, Kozmin, Y. P., Titov, M. I., Körner, R., Sönksen, C. P. and Roepstorff, P.** (2000). Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using (18)O-labeled internal standards. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* **14**, 1226–32.
- Moitra, K. and Dean, M.** (2011). Evolution of ABC transporters by gene duplication and their role in human disease. *Biological chemistry* **392**, 29–37.

- Molina, H., Yang, Y., Ruch, T., Kim, J., Mortensen, P., Ψ, A. N., Tang, Q., Lane, M. D., Chaerkady, R. and Pandey, A.** (2010). NIH Public Access. **8**, 48–58.
- Motoyama, A. and Yates, J. R.** (2008). Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. *Analytical chemistry* **80**, 7187–93.
- Mysiorek, C., Culot, M., Dehouck, L., Derudas, B., Staels, B., Bordet, R., Cecchelli, R., Fenart, L. and Berezowski, V.** (2009). Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor- α Activation Protects Brain Capillary Endothelial Cells from Oxygen-glucose Deprivation-induced Hyperpermeability in the Blood-brain Barrier. *Curr Neurovasc Res* **6**(3), 181–93.
- Méresse, S., Dehouck, M. P., Delorme, P., Bensaïd, M., Tauber, J. P., Delbart, C., Fruchart, J. C., Cecchelli, R. and Bensaïd, M.** (1989). Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J Neurochem* **53**, 1363–1371.
- Nag, S.** (1990). Presence of transendothelial channels in cerebral endothelium in chronic hypertension. *Acta neurochirurgica. Supplementum* **51**, 335–7.
- Nag, S.** (2003). Pathophysiology of blood-brain barrier breakdown. *Methods Mol Med* **89**, 97–119.
- Nag, S.** (2011). Morphology and properties of brain endothelial cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **686**, 3–47.
- Naik, P. and Cucullo, L.** (2012). In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *Journal of pharmaceutical sciences* **101**, 1337–54.
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Nakao, S., Honda, M., Hayashi, K., Nakaoke, R., Kataoka, Y. and Niwa, M.** (2007). Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* **27**, 687–694.
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, A., Tanaka, K. and Niwa, M.** (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry international* **54**, 253–63.
- Nakazato, H., Deguchi, M., Fujimoto, M. and Fukushima, H.** (1997). Alkaline phosphatase expression in cultured endothelial cells of aorta and brain microvessels: induction by interleukin-6-type cytokines and suppression by transforming growth factor betas. *Life sciences* **61**, 2065–72.
- Naslavsky, N. and Caplan, S.** (2005). C-terminal EH-domain-containing proteins: consensus for a role in endocytic trafficking, EH? *Journal of cell science* **118**, 4093–101.
- Naslavsky, N., Rahajeng, J., Chenavas, S., Sorgen, P. L. and Caplan, S.** (2007a). EHD1 and Eps15 interact with phosphatidylinositols via their Eps15 homology domains. *The Journal of biological chemistry* **282**, 16612–22.
- Naslavsky, N., Rahajeng, J., Rapaport, D., Horowitz, M. and Caplan, S.** (2007b). EHD1 regulates cholesterol homeostasis and lipid droplet storage. *Biochemical and biophysical research communications* **357**, 792–9.
- Nedergaard, M., Ransom, B. and Goldman, S. A.** (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences* **26**, 523–30.
- Nesvizhskii, A. I. and Aebersold, R.** (2005). Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **4**, 1419–40.
- Nesvizhskii, A. I., Vitek, O. and Aebersold, R.** (2007). Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nature methods* **4**, 787–97.
- Ngarmukos, C., Baur, E. L. and Kumagai, A. K.** (2001). Co-localization of GLUT1 and GLUT4 in the blood-brain barrier of the rat ventromedial hypothalamus. *Brain research* **900**, 1–8.

- Nielsen, S., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P. and Ottersen, O. P.** (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 171–80.
- Oby, E. and Janigro, D.** (2006). The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* **47**, 1761–74.
- Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D. and Chait, B. T.** (1999). Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6591–6.
- Ohtsuki, S. and Terasaki, T.** (2007). Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res* **24**, 1745–1758.
- Ohtsuki, S., Yamaguchi, H., Katsukura, Y., Asashima, T. and Terasaki, T.** (2008). mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem* **104**, 147–154.
- Oldendorf, W. H.** (1970). Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain research* **24**, 372–6.
- Oldendorf, W. H.** (1971a). Uptake of radiolabeled essential amino acids by brain following arterial injection. *Proc Soc Exp Biol Med* **136**, 385–386.
- Oldendorf, W. H.** (1971b). Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol* **221**, 1629–1639.
- Oldendorf, W. H., Cornford, M. E. and Brown, W. J.** (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Annals of neurology* **1**, 409–17.
- Ong, S.-E.** (2002). Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**, 376–386.
- Ong, S.-E., Kratchmarova, I. and Mann, M.** (2003). Properties of ¹³C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Journal of proteome research* **2**, 173–81.
- O'Donnell, M. E., Lam, T. I., Tran, L. Q., Foroutan, S. and Anderson, S. E.** (2006). Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **26**, 1234–49.
- O'Farrell, P. H.** (1975). NIH Public Access. **250**, 4007–4021.
- Panchaud, A., Affolter, M., Moreillon, P. and Kussmann, M.** (2008). Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook. *J Proteomics* **71**, 19–33.
- Panula, P., Joó, F. and Rechart, L.** (1978). Evidence for the presence of viable endothelial cells in cultures derived from dissociated rat brain. *Experientia* **34**, 95–7.
- Papaioannou, M. D., Lagarrigue, M., Vejnar, C. E., Rolland, A. D., Kühne, F., Aubry, F., Schaad, O., Fort, A., Descombes, P., Neerman-Arbez, M., et al.** (2010). Loss of Dicer in Sertoli cells has a major impact on the testicular proteome of mice. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **10**, M900587MCP200.
- Pappin, D. J., Hojrup, P. and Bleasby, A. J.** (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current biology: CB* **3**, 327–32.

- Pardridge, W. M.** (1998). *Isolated brain capillaries: an in vitro model of blood–brain barrier research. Introduction to the Blood-Brain Barrier: Methodology, Biology and Pathology.* (ed. Pardridge, W. M.) Cambridge: Cambridge University Press.
- Pardridge, W. M.** (2006). Molecular Trojan horses for blood-brain barrier drug delivery. *Current opinion in pharmacology* **6**, 494–500.
- Pardridge, W. M.** (2007). Blood-brain barrier delivery. *Drug discovery today* **12**, 54–61.
- Pardridge, W. M., Boado, R. J. and Farrell, C. R.** (1990). Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem* **265**, 18035–18040.
- Parton, R. G., Joggerst, B. and Simons, K.** (1994). Regulated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology* **127**, 1199–215.
- Paša-Tolić, L., Jensen, P. K., Anderson, G. A., Lipton, M. S., Peden, K. K., Martinović, S., Tolić, N., Bruce, J. E. and Smith, R. D.** (1999). High Throughput Proteome-Wide Precision Measurements of Protein Expression Using Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 7949–7950.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. and Cottrell, J. S.** (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551–67.
- Perrière, N., Demeuse, P., Garcia, E., Regina, A., Debray, M., Andreux, J.-P., Couvreur, P., Scherrmann, J.-M., Tamsamani, J., Couraud, P.-O., et al.** (2005). Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *Journal of neurochemistry* **93**, 279–89.
- Peterson, G. L.** (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346–356.
- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J. and Vulpe, C. D.** (2008). Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* **8**, 1744–9.
- Pieri, L., Madiona, K., Bousset, L. and Melki, R.** (2012). Fibrillar α -synuclein and huntingtin exon 1 assemblies are toxic to the cells. *Biophysical journal* **102**, 2894–905.
- Plateel, M., Dehouck, M. P., Torpier, G., Cecchelli, R. and Teissier, E.** (1995). Hypoxia increases the susceptibility to oxidant stress and the permeability of the blood-brain barrier endothelial cell monolayer. *J Neurochem* **65**, 2138–2145.
- Plateel, M., Teissier, E. and Cecchelli, R.** (1997). Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem* **68**, 874–877.
- Poelstra, K., Bakker, W. W., Klok, P. A., Hardonk, M. J. and Meijer, D. K.** (1997). A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **76**, 319–27.
- Pont, F. and Fournié, J. J.** (2010). Sorting protein lists with nwCompare: a simple and fast algorithm for n-way comparison of proteomic data files. *Proteomics* **10**, 1091–4.
- Pottiez, G., Sevin, E., Cecchelli, R., Karamanos, Y. and Flahaut, C.** (2009). Actin, gelsolin and filamin-A are dynamic actors in the cytoskeleton remodelling contributing to the blood brain barrier phenotype. *Proteomics* **9**, 1207–1219.
- Pottiez, G., Deracinois, B., Duban-Deweere, S., Cecchelli, R., Fenart, L., Karamanos, Y. and Flahaut, C.** (2010a). A large-scale electrophoresis- and chromatography-based determination of gene

- expression profiles in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties. *Proteome Sci* **8**, 57.
- Pottiez, G., Deracinois, B., Duban-Deweere, S., Cecchelli, R., Fenart, L., Karamanos, Y. and Flahaut, C.** (2010b). A large-scale electrophoresis- and chromatography-based determination of gene expression profiles in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties. *Proteome science* **8**, 57.
- Pottiez, G., Duban-Deweere, S., Deracinois, B., Gosselet, F., Camoin, L., Hachani, J., Couraud, P.-O., Cecchelli, R., Dehouck, M.-P., Fenart, L., et al.** (2011). A differential proteomic approach identifies structural and functional components that contribute to the differentiation of brain capillary endothelial cells. *Journal of proteomics* **75**, 628–41.
- Qiu, Y., Sousa, E. A., Hewick, R. M. and Wang, J. H.** (2002). Acid-labile isotope-coded extractants: a class of reagents for quantitative mass spectrometric analysis of complex protein mixtures. *Analytical chemistry* **74**, 4969–79.
- Rabilloud, T.** (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3–10.
- Rabilloud, T. and Lelong, C.** (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of proteomics* **74**, 1829–41.
- Rabilloud, T., Strub, J. M., Luche, S., van Dorsselaer, A. and Lunardi, J.** (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**, 699–704.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. I. and Mann, M.** (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome research* **12**, 1231–45.
- Raub, T. J., Kuentzel, S. L. and Sawada, G. A.** (1992). Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp Cell Res* **199**, 330–340.
- Reddy, M. K., Wu, L., Kou, W., Ghorpade, A. and Labhasetwar, V.** (2008). Superoxide dismutase-loaded PLGA nanoparticles protect cultured human neurons under oxidative stress. *Applied biochemistry and biotechnology* **151**, 565–77.
- Reese, T. S. and Karnovsky, M. J.** (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* **34**, 207–217.
- Reichel, A.** (2009). Addressing central nervous system (CNS) penetration in drug discovery: basics and implications of the evolving new concept. *Chemistry & biodiversity* **6**, 2030–49.
- Reichel, A. and Begley, D. J.** (1998). Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *Pharmaceutical research* **15**, 1270–4.
- Resemann, A., Evers, W. and Suckau, D.** (2010). Isotope-Coded Protein Labeling (ICPL) for Quantitative Proteomics Workflows Compatible with Protein Separation Strategies. *Bruker Daltonics Application Note # MT-106 #272104*.
- Rezende, A. A., Pizauro, J. M., Ciancaglini, P. and Leone, F. A.** (1994). Phosphodiesterase activity is a novel property of alkaline phosphatase from osseous plate. *The Biochemical journal* **301** (Pt 2, 517–22.
- Richter, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M. R., Morgan, G. P., Marsh, B. J. and Parton, R. G.** (2008). High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **9**, 893–909.

- Riederer, B. M.** (2008). Non-covalent and covalent protein labeling in two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of proteomics* **71**, 231–44.
- Riggs, L., Seeley, E. H. and Regnier, F. E.** (2005). Quantification of phosphoproteins with global internal standard technology. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **817**, 89–96.
- Risau, W., Dingler, A., Albrecht, U., Dehouck, M. P. and Cecchelli, R.** (1992). Blood-brain barrier pericytes are the main source of gamma-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. *J Neurochem* **58**, 667–672.
- Ros, A., Faupel, M., Mees, H., Oostrum, J. van, Ferrigno, R., Reymond, F., Michel, P., Rossier, J. S. and Girault, H. H.** (2002). Protein purification by Off-Gel electrophoresis. *Proteomics* **2**, 151–6.
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., et al.** (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **3**, 1154–69.
- Roux, F. and Couraud, P.-O.** (2005). Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cellular and molecular neurobiology* **25**, 41–58.
- Roux, F., Durieu-Trautmann, O., Chaverot, N., Claire, M., Maily, P., Bourre, J. M., Strosberg, A. D. and Couraud, P. O.** (1994). Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *Journal of cellular physiology* **159**, 101–13.
- Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., Janatpour, M., Liaw, C. W., Manning, K., Morales, J., et al.** (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* **115**, 1725–1735.
- Ruchoux, M. M., Brulin, P., Brillault, J., Dehouck, M. P., Cecchelli, R. and Bataillard, M.** (2002). Lessons from CADASIL. *Ann N Y Acad Sci* **977**, 224–231.
- Saint-Pol, J., Vandenhaute, E., Boucau, M.-C., Candela, P., Dehouck, L., Cecchelli, R., Dehouck, M.-P., Fenart, L. and Gosselet, F.** (2012). Brain Pericytes ABCA1 Expression Mediates Cholesterol Efflux but not Cellular Amyloid- β Peptide Accumulation. *Journal of Alzheimer's Disease* **30**, 489–503.
- Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y. and Tsukita, S.** (1997). Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* **137**, 1393–1401.
- Sano, Y., Shimizu, F., Abe, M., Maeda, T., Kashiwamura, Y., Ohtsuki, S., Terasaki, T., Obinata, M., Kajiwara, K., Fujii, M., et al.** (2010). Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. *Journal of cellular physiology* **225**, 519–28.
- Sarioglu, H., Brandner, S., Jacobsen, C., Meindl, T., Schmidt, A., Kellermann, J., Lottspeich, F. and Andrae, U.** (2006). Quantitative analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced proteome alterations in 5L rat hepatoma cells using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **6**, 2407–21.
- Schiera, G., Sala, S., Gallo, A., Raffa, M. P., Pitarresi, G. L., Savettieri, G. and Di Liegro, I.** (2005). Permeability properties of a three-cell type in vitro model of blood-brain barrier. *Journal of cellular and molecular medicine* **9**, 373–9.
- Schmidt, A., Kellermann, J. and Lottspeich, F.** (2005). A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **5**, 4–15.

- Schroeter, M. L., Mertsch, K., Giese, H., Muller, S., Sporberr, A., Hickel, B. and Blasig, I. E.** (1999). Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. *FEBS Lett* **449**, 241–244.
- Sechi, S.** (2002). A method to identify and simultaneously determine the relative quantities of proteins isolated by gel electrophoresis. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* **16**, 1416–24.
- Segal, M. B.** (2000). The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid. *Cellular and molecular neurobiology* **20**, 183–96.
- Sevinsky, J. R., Brown, K. J., Cargile, B. J., Bundy, J. L. and Jr, L. S.** (2009). NIH Public Access. *Water* **79**, 2158–2162.
- Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Dumas-Dupont, C., Couraud, P.-O., et al.** (2011). Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Molecular pharmaceutics* **8**, 1332–41.
- Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T. and Abeliovich, A.** (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS biology* **2**, e362.
- Shepro, D. and Morel, N. M.** (1993). Pericyte physiology. *Faseb J* **7**, 1031–1038.
- Shivers, R. R., Betz, A. L. and Goldstein, G. W.** (1984). Isolated rat brain capillaries possess intact, structurally complex, interendothelial tight junctions; freeze-fracture verification of tight junction integrity. *Brain research* **324**, 313–22.
- Siddharthan, V., Kim, Y. V., Liu, S. and Kim, K. S.** (2007). Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain research* **1147**, 39–50.
- Simpson, I. A., Carruthers, A. and Vannucci, S. J.** (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 1766–1791.
- Siuti, N. and Kelleher, N. L.** (2007). Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nature methods* **4**, 817–21.
- Smith, Q. R.** (2003). A review of blood-brain barrier transport techniques. *Methods in molecular medicine* **89**, 193–208.
- Smith, M. A., Hirai, K., Hsiao, K., Pappolla, M. A., Harris, P. L., Siedlak, S. L., Tabaton, M. and Perry, G.** (1998). Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *Journal of neurochemistry* **70**, 2212–5.
- Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M. E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K., et al.** (1999). Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neuroscience research* **35**, 155–64.
- Solon, E. G.** (2012). Use of radioactive compounds and autoradiography to determine drug tissue distribution. *Chemical research in toxicology* **25**, 543–55.
- Sparbier, K., Koch, S., Kessler, I., Wenzel, T. and Kostrzewa, M.** (2005). Selective isolation of glycoproteins and glycopeptides for MALDI-TOF MS detection supported by magnetic particles. *Journal of biomolecular techniques : JBT* **16**, 407–13.
- Staes, A., Demol, H., Van Damme, J., Martens, L., Vandekerckhove, J. and Gevaert, K.** (2004). Global differential non-gel proteomics by quantitative and stable labeling of tryptic peptides with oxygen-18. *Journal of proteome research* **3**, 786–91.

- Stanness, K. A., Guatteo, E. and Janigro, D.** (1996). A dynamic model of the blood-brain barrier "in vitro". *Neurotoxicology* **17**, 481–96.
- Staub, A., Schappler, J., Rudaz, S. and Veuthey, J.-L.** (2009). CE-TOF/MS: fundamental concepts, instrumental considerations and applications. *Electrophoresis* **30**, 1610–23.
- Steinberg, T. H., Jones, L. J., Haugland, R. P. and Singer, V. L.** (1996). SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Analytical biochemistry* **239**, 223–37.
- Steinberg, T. H., Pretty On Top, K., Berggren, K. N., Kemper, C., Jones, L., Diwu, Z., Haugland, R. P. and Patton, W. F.** (2001). Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots. *Proteomics* **1**, 841–55.
- Steinberg, T. H., Agnew, B. J., Gee, K. R., Leung, W.-Y., Goodman, T., Schulenberg, B., Hendrickson, J., Beechem, J. M., Haugland, R. P. and Patton, W. F.** (2003). Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology. *Proteomics* **3**, 1128–44.
- Stern, L. and Gautier, R.** (1922). Les rapports entre le liquide céphalo-rachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal. *Arch Inter Physiol* **17**, 391–488.
- Stevenson, B. R. and Begg, D. A.** (1994). Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells. *Journal of cell science* **107** (Pt 3), 367–75.
- Stewart, I. I., Thomson, T. and Figeys, D.** (2001). 18O labeling: a tool for proteomics. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* **15**, 2456–65.
- Stuart, R. O., Sun, A., Panichas, M., Hebert, S. C., Brenner, B. M. and Nigam, S. K.** (1994). Critical role for intracellular calcium in tight junction biogenesis. *Journal of cellular physiology* **159**, 423–33.
- Suckau, D., Hahner, S., Brand, S., Jabs, W., Schürenberg, M. and Halder, T. M.** (2006). ICPL: A new quantitative mass spectrometric method for proteomics. *Bruker Daltonics, Application Notes MT-78*.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Minguéz, P., Doerks, T., Stark, M., Müller, J., Bork, P., et al.** (2011). The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic acids research* **39**, D561–8.
- Takahashi-Niki, K., Niki, T., Iguchi-Ariga, S. and Ariga, H.** (2012). Function of DJ-1 in Mitochondria. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **132**, 1105–10.
- Takai, N., Tanaka, Y., Inazawa, K. and Saji, H.** (2012). Quantitative analysis of pharmaceutical drug distribution in multiple organs by imaging mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* **26**, 1549–56.
- Takasato, Y., Rapoport, S. I. and Smith, Q. R.** (1984). An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *The American journal of physiology* **247**, H484–93.
- Tam, S. J. and Watts, R. J.** (2010). Connecting vascular and nervous system development: angiogenesis and the blood-brain barrier. *Annual review of neuroscience* **33**, 379–408.
- Tamai, I., Sai, Y., Kobayashi, H., Kamata, M., Wakamiya, T. and Tsuji, A.** (1997). Structure-internalization relationship for adsorptive-mediated endocytosis of basic peptides at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **280**, 410–415.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. and Matsuo, T.** (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2**, 151–153.
- Taylor, E. M., Crowe, A. and Morgan, E. H.** (1991). Transferrin and iron uptake by the brain: effects of altered iron status. *Journal of neurochemistry* **57**, 1584–92.

- Taylor, C. J., Nicola, P. A., Wang, S., Barrand, M. A. and Hladky, S. B.** (2006). Transporters involved in regulation of intracellular pH in primary cultured rat brain endothelial cells. *J Physiol* **576**, 769–785.
- Tebbe, A., Schmidt, A., Konstantinidis, K., Falb, M., Bisle, B., Klein, C., Aivaliotis, M., Kellermann, J., Siedler, F., Pfeiffer, F., et al.** (2009). Life-style changes of a halophilic archaeon analyzed by quantitative proteomics. *Proteomics* **9**, 3843–55.
- Terry, S., Nie, M., Matter, K. and Balda, M. S.** (2010). Rho signaling and tight junction functions. *Physiology (Bethesda, Md.)* **25**, 16–26.
- Thanabalasundaram, G., Pieper, C., Lischper, M. and Galla, H.-J.** (2010). Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain research* **1347**, 1–10.
- Thanabalasundaram, G., El-Gindi, J., Lischper, M. and Galla, H.-J.** (2011). Methods to assess pericyte-endothelial cell interactions in a coculture model. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **686**, 379–99.
- Thomas, C. M. and Smart, E. J.** (2008). Caveolae structure and function. *Journal of cellular and molecular medicine* **12**, 796–809.
- Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A. K. A. and Hamon, C.** (2003). Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical chemistry* **75**, 1895–1904.
- Thompson, M. D., Nezarati, M. M., Gillesen-Kaesbach, G., Meinecke, P., Mendoza-Londono, R., Mendoza, R., Mornet, E., Brun-Heath, I., Squarcioni, C. P., Legeai-Mallet, L., et al.** (2010). Hyperphosphatasia with seizures, neurologic deficit, and characteristic facial features: Five new patients with Mabry syndrome. *American journal of medical genetics. Part A* **152A**, 1661–9.
- Tilling, T., Korte, D., Hoheisel, D. and Galla, H. J.** (1998). Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem* **71**, 1151–1157.
- Tilton, R. G., Miller, E. J., Kilo, C. and Williamson, J. R.** (1985). Pericyte form and distribution in rat retinal and uveal capillaries. *Investigative ophthalmology & visual science* **26**, 68–73.
- Tontsch, U. and Bauer, H. C.** (1991). Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain research* **539**, 247–53.
- Tsukita, S. and Furuse, M.** (2000). Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *The Journal of cell biology* **149**, 13–6.
- Turtoi, a, Mazzucchelli, G. D. and De Pauw, E.** (2010). Isotope coded protein label quantification of serum proteins--comparison with the label-free LC-MS and validation using the MRM approach. *Talanta* **80**, 1487–95.
- Tyers, M. and Mann, M.** (2003). From genomics to proteomics. *Nature* **422**, 193–7.
- Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J. and Terasaki, T.** (2011). Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *Journal of neurochemistry* **117**, 333–45.
- Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J. P., Nishida, K., Murphy, T. J., Alexander, R. W., Nerem, R. M. and Harrison, D. G.** (1995). Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *The American journal of physiology* **269**, C1371–8.
- Unlü, M., Morgan, M. E. and Minden, J. S.** (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071–7.

- Van Hoof, V. O. and De Broe, M. E.** (1994). Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **31**, 197–293.
- Vandenhoute, E., Dehouck, L., Boucau, M.-C., Sevin, E., Uzbekov, R., Tardivel, M., Gosselet, F., Fenart, L., Cecchelli, R. and Dehouck, M.-P.** (2011). Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes. *Current neurovascular research* **8**, 258–69.
- Vandenhoute, E., Sevin, E., Hallier-Vanuxeem, D., Dehouck, M.-P. and Cecchelli, R.** (2012). Case study: adapting in vitro blood-brain barrier models for use in early-stage drug discovery. *Drug discovery today* **17**, 285–90.
- Vardy, E. R. L. C., Kellett, K. A. B., Cocklin, S. L. and Hooper, N. M.** (2012). Alkaline phosphatase is increased in both brain and plasma in Alzheimer's disease. *Neuro-degenerative diseases* **9**, 31–7.
- Vigne, P., Champigny, G., Marsault, R., Barbry, P., Frelin, C. and Lazdunski, M.** (1989). A new type of amiloride-sensitive cationic channel in endothelial cells of brain microvessels. *The Journal of biological chemistry* **264**, 7663–8.
- Villegas, J. C. and Broadwell, R. D.** (1993). Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. II. Adsorptive transcytosis of WGA-HRP and the blood-brain and brain-blood barriers. *Journal of neurocytology* **22**, 67–80.
- Visser, C. C., Voorwinden, L. H., Crommelin, D. J., Danhof, M. and de Boer, A. G.** (2004). Characterization and modulation of the transferrin receptor on brain capillary endothelial cells. *Pharm Res* **21**, 761–769.
- Vizcaíno, J. A., Côté, R., Reisinger, F., Barsnes, H., Foster, J. M., Rameseder, J., Hermjakob, H. and Martens, L.** (2010). The Proteomics Identifications database: 2010 update. *Nucleic acids research* **38**, D736–42.
- Voyksner, R. D. and Lee, H.** (1999). Investigating the use of an octupole ion guide for ion storage and high-pass mass filtering to improve the quantitative performance of electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* **13**, 1427–37.
- Wang, Z., Mandell, K. J., Parkos, C. A., Mrsny, R. J. and Nusrat, A.** (2005). The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. *Oncogene* **24**, 4412–20.
- Wang, R., Fabregat, A., Ríos, D., Ovelleiro, D., Foster, J. M., Côté, R. G., Griss, J., Csordas, A., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., et al.** (2012). PRIDE Inspector: a tool to visualize and validate MS proteomics data. *Nature biotechnology* **30**, 135–7.
- Waymire, K. G., Mahuren, J. D., Jaje, J. M., Guilarte, T. R., Coburn, S. P. and MacGregor, G. R.** (1995). Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nature genetics* **11**, 45–51.
- Weckwerth, W., Willmitzer, L. and Fiehn, O.** (2000). Comparative quantification and identification of phosphoproteins using stable isotope labeling and liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* **14**, 1677–81.
- Wegener, J., Hakvoort, A. and Galla, H. J.** (2000). Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by cAMP-dependent pathways in vitro. *Brain research* **853**, 115–24.
- Weidenfeller, C., Svendsen, C. N. and Shusta, E. V.** (2007). Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *Journal of neurochemistry* **101**, 555–65.
- Weksler, B. B., Subileau, E. A., Perrière, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., et al.** (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *Faseb J* **19**, 1872–1874.

- Westergren, I., Nyström, B., Hamberger, A. and Johansson, B. B.** (1995). Intracerebral dialysis and the blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry* **64**, 229–34.
- Whyte, M. P.** (1994). Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrine reviews* **15**, 439–61.
- Whyte, M. P.** (2010). Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1192**, 190–200.
- Wiese, S., Reidegeld, K. a, Meyer, H. E. and Warscheid, B.** (2007). Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* **7**, 340–50.
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Sanchez, J. C., Appel, R. D. and Hochstrasser, D. F.** (1996). Protein identification with sequence tags. *Curr Biol* **6**, 1543–1544.
- Wiśniewski, J. R., Duś, K. and Mann, M.** (2012). Proteomic workflow for analysis of archival formalin fixed and paraffin embedded clinical samples to a depth of 10,000 proteins. *Proteomics. Clinical applications*.
- Wolburg, H. and Lippoldt, A.** (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* **38**, 323–337.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E. M., Ocalan, M., Farrell, C. and Risau, W.** (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* **107 (Pt 5)**, 1347–1357.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K. and Fallier-Becker, P.** (2009). Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell and tissue research* **335**, 75–96.
- Wolf-Yadlin, A., Hautaniemi, S., Lauffenburger, D. a and White, F. M.** (2007). Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5860–5.
- Wolff, J. R. and Bar, T.** (1972). “Seamless” endothelia in brain capillaries during development of the rat’s cerebral cortex. *Brain Res* **41**, 17–24.
- Wu, Z.-Y., Pan, J., Yuan, Y., Hui, A.-L., Yang, Y. and Zhou, A.** (2012). Comparison of prediction models for blood brain barrier permeability and analysis of the molecular descriptors. *Die Pharmazie* **67**, 628–34.
- Yamaguchi, A., Urano, T., Goi, T. and Feig, L. A.** (1997). An Eps homology (EH) domain protein that binds to the Ral-GTPase target, RalBP1. *The Journal of biological chemistry* **272**, 31230–4.
- Yamamoto, N., Sobue, K., Miyachi, T., Inagaki, M., Miura, Y., Katsuya, H. and Asai, K.** (2001). Differential regulation of aquaporin expression in astrocytes by protein kinase C. *Brain research. Molecular brain research* **95**, 110–6.
- Yamashita, M. and Fenn, J. B.** (1984). Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry* **88**, 4451–4459.
- Yarlagadda, A. and Clayton, A. H.** (2007). Blood brain barrier: the role of pyridoxine. *Psychiatry (Edgmont (Pa.: Township))* **4**, 58–60.
- Yates, J. R., Speicher, S., Griffin, P. R. and Hunkapiller, T.** (1993). Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Analytical biochemistry* **214**, 397–408.
- Yu, C., Kastin, A. J., Ding, Y. and Pan, W.** (2007). Gamma glutamyl transpeptidase is a dynamic indicator of endothelial response to stroke. *Experimental neurology* **203**, 116–22.

-
- Zehendner, C. M., Luhmann, H. J. and Kuhlmann, C. R. W.** (2009). Studying the neurovascular unit: an improved blood-brain barrier model. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **29**, 1879–84.
- Zenker, D., Begley, D., Bratzke, H., Rübsamen-Waigmann, H. and von Briesen, H.** (2003). Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. *The Journal of physiology* **551**, 1023–32.
- Zhu, W., Smith, J. W. and Huang, C.-M.** (2010). Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, 840518.
- Zimin, A. V., Delcher, A. L., Florea, L., Kelley, D. R., Schatz, M. C., Puiu, D., Hanrahan, F., Pertea, G., Van Tassell, C. P., Sonstegard, T. S., et al.** (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome biology* **10**, R42.
- Zlokovic, B. V.** (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**, 178–201.
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A. A., Pozzan, T. and Carmignoto, G.** (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* **6**, 43–50.